



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

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

## Deflazacort vs. Prednisona en la inducción de alteraciones neuronales y gliales en el cerebro de la rata

Tesis

que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO  
(OPCIÓN NEUROCIENCIAS)**

presenta

**Estela Adriana Castellanos Alvarado**

Comité tutorial

**Mtro. César Ramos Remus (Director)**

Dr. Joaquín García Estrada

Dr. Jorge Juárez González

Dr. Óscar Porfirio González Pérez (asesor)

Mtra. Rocío Elizabeth González Castañeda (asesor)

Guadalajara, Jalisco

Abril de 2006

*A Ma. Felix  
Te extraño siempre...*

## Dedicatorias

---

A Eduardo Castellanos Alvarado, gracias por ser mi apoyo en todo momento, compañía y ser la persona a quien más admiro y quiero en la vida.

A Estela Alvarado y Bibiano Castellanos Berrospe, mis padres quienes me introdujeron a los placeres de la comprensión del Universo.

A Ma. Concepción Castellanos Berrospe, por regalarme el libro del Principito e iniciarme en el placer a la lectura.

A Memo Alvarado, por salvarme la vida a los 10 años cuando tuve escarlatina y por inspirarme a estudiar medicina.

A Enrique Sánchez Pérez Verdía por ser mi mejor amigo, por darme su apoyo incondicional escuchándome largas horas mis sandeces en lo triste y alegre de la vida.

A Felipe Arias González por conocerlo e inspirarme nuevas cosas en la vida....

A Oscar González Pérez por ser mi amigo, y por tener una familia muy bonita.

Al Dr. Juan Manuel Riestra Ramírez (Padre) gracias por compartir tu libro de la Conciencia, por confiar, te extraño...

A Ma. Isabel Pérez Vega por ser mi amiga y confirmarme lo bello de las Neurociencias.

Al Ing. Alonso Castillo Pérez por que mi cerebro tiene una fascinación a su retórica, muchas gracias por ser mi amigo.

A mis amigas Carolina, Gaby y Lucy por apoyarme, por acompañarme.

Y a mi cerebro derecho, el perceptivo que domina mi lado izquierdo y que puede intuir en un ensueño la grandeza de Dios.

## **Agradecimientos**

---

Al Dr. César Ramos Remus por su apoyo a muchos jóvenes que nos iniciamos en la ciencia, pues sin su apoyo no sería posible escribir, publicar y gracias por ser mi director de tesis.

Al Dr. Óscar González Pérez por apoyarme en todo este proyecto de investigación, por confiar en mí y enseñarme el método científico de la ciencia.

Al Dr. Joaquín García Estrada y a la Dra. Sonia Luquín de Anda por prestar su laboratorio para los experimentos de este proyecto.

Al Dr. Jorge Juárez González por sus observaciones a esta tesis.

A la Dra. Maria Rosa Flores Márquez por su apoyo a los experimentos de anatomía patológica de este proyecto.

A la Mtra. Rocío Elizabeth González Castañeda y la Mtra. Martha Morales por apoyarme y ayudarme en los experimentos de esta tesis.

## Agradecimientos

---

A las Instituciones que apoyaron este proyecto:

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). Número de proyecto: 2002249017, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Instituto de Neurociencias, programa de Doctorado en Ciencias del comportamiento (opción Neurociencias). Universidad de Guadalajara.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Número de becario: 11649.

## Índice

---

<b>Abreviaturas y siglas</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>I. Introducción</b>	
Historia de los glucocorticoides	6
Glucocorticoides	6
Mecanismo de acción de los glucocorticoides	7
Receptores a glucocorticoides	7
Glucocorticoides sintéticos	8
Prednisona	8
Deflazacort	9
Glucocorticoides y celularidad cerebral	10
Neuronas	11
Microglia	12
Astrocitos	15
Interacción del Sistema Nervioso Central y el Sistema Inmunológico	17
<b>II. Antecedentes</b>	<b>18</b>
<b>III. Planteamiento del Problema</b>	<b>21</b>
<b>IV. Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>V. Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>VI. Materiales y métodos</b>	
Grupos experimentales	22
Diseño experimental	23
Perfusión intracardiaca para fijación del cerebro	25

Evaluación neuronal	26
Tinción de hematoxilina y eosina	26
Análisis cuantitativo neuronal	27
Análisis inmunocitoquímico e histoquímica para células de la glia	27
Análisis de inmunomarcaje de astrocitos	28
Análisis histoquímico para célula de microglia.	29
Análisis morfométrico	30
Análisis estadístico	31
<b>VII. Resultados</b>	
Evaluación del índice de neurodegeneración	31
Análisis inmunocitoquímico de astrocitos	33
Análisis histoquímico de célula de microglia	34
<b>VIII. Discusión</b>	37
<b>IX. Conclusiones</b>	40
<b>X. Bibliografía</b>	40
<b>XI. Anexos</b>	

## Abreviaturas y siglas

---

<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa
<b>AVP</b>	Hormona arginina vasopresina
<b>CORT</b>	Corticosterona
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Calcio
<b>DFZ</b>	Deflazacort
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Ácido gamma- aminobutírico
<b>NMDA</b>	N-metil-D-Aspartato
<b>MR</b>	Receptor a mineralocorticoides
<b>GR</b>	Receptor a glucocorticoides
<b>CRH</b>	Corticotropina
<b>PDN</b>	Prednisona
<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular
<b>HPA</b>	Eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral
<b>IF<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>GFAP</b>	Proteína acídica fibrilar glial
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistémico
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>DNA</b>	Adenosin difosfato



<b>GR</b>	Receptor a glucocorticoide
<b>MR</b>	Receptor a mineralocorticoide
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformador $\beta$
<b>M-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de macrófagos
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ECM</b>	Proteína trombospondina
<b>LFA-1</b>	Antígeno-1 asociado con la función leucocítica
<b>ED-1</b>	Marcador de células fagocíticas
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-3</b>	Interleucina 3
<b>P2X7</b>	Receptor purinérgico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>NO</b>	Oxido nítrico
<b>OGD</b>	Deprivación de oxígeno-glucosa
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistémico
<b>AR</b>	Artritis reumatoide
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

## Resumen

---

**Antecedentes:** La Prednisona (PDN) produce alteraciones en el funcionamiento cognitivo y en las estructuras cerebrales en humanos y animales. El Deflazacort (DFZ) es un glucocorticoide sintético, con supuestos menores efectos colaterales que la PDN.

**Objetivo:** Evaluar si la administración crónica de DFZ a los 90 días produce menor neurodegeneración y reactividad glial que PDN.

**Metodología:** Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas macho Swiss-Wistar. Se conformaron tres grupos: un grupo control que recibió 0.1ml de agua destilada por vía oral. Un grupo de Prednisona (PDN) que recibió 5mg/Kg/día de PDN por vía oral y el grupo de Deflazacort (DFZ) que recibió 6mg/Kg/día de DFZ también por vía oral. Este estudio se realizó en cuatro diferentes ocasiones, debido a la alta tasa de mortalidad registrada en el grupo de DFZ. En el cuarto experimento se utilizó solamente el grupo de DFZ y los grupos de PDN y control de un previo estudio que fueron usados para compararlos. El índice de neurodegeneración, el número y transformación citoplasmática de los astrocitos y de las células de la microglia fueron evaluados en la corteza prefrontal, en la región CA1 y la región CA3 del hipocampo.

**Resultados:** La mortalidad fue del 49% en el grupo de DFZ, 4.5% en el grupo de PDN y ninguna murió en el grupo Control. Las necropsias de rutina mostraron infección en múltiples órganos. La PDN presentó dos veces mayor el índice de neurodegeneración en la corteza prefrontal, casi siete veces más en la región CA1 y cuatro veces en la región CA3 del hipocampo cuando se comparó con el grupo control y el grupo de DFZ. La reactividad astrocítica se incrementó en las ratas expuestas a la PDN y DFZ comparadas con el grupo control. El grupo de DFZ mostró un promedio cuatro veces menor de células microgliales en las tres regiones estudiadas cuando se compararon con el grupo de PDN.

**Conclusiones:** Parece ser que el DFZ produce un mayor efecto inmunosupresor en tejido cerebral y sistémico al compararlo con el grupo que recibió PDN, e induce menor daño neuronal que la PDN. La preservación de la viabilidad neural por DFZ sugiere que este fármaco puede ser más útil para el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes relacionadas con el sistema nervioso central (SNC).

## **Abstract**

---

**Background:** Prednisone (PDN) impairs cognitive functioning and brain structures in humans and animals. Deflazacort (DFZ) is a synthetic glucocorticoid claimed to have less side effects than prednisone.

**Objective:** To assess whether chronic administration (90 days) of DFZ produces less neuronal degeneration and glial reactivity than PDN.

**Methods:** Male Swiss-Wistar rats were studied. Controls received 0.1 ml distilled water orally. The PDN group received prednisone 5 mg/kg/day orally, and the DFZ group received deflazacort 6 mg/kg/day orally. This model had to be assembled in three different occasions due to excess mortality in the DFZ group. A four model was assembled using only the DFZ group and slides of water- and PDN-exposed rats from a previous study were used as comparators. The index of degenerated neurons and the number and cytoplasmic transformation of astrocytes and microglia cells were evaluated in the prefrontal cortex, CA1 and CA3 hippocampus.

**Results:** The overall mortality was 49% in the DFZ group, 4.5% in the PDN group and none of the controls died. Routine necropsy showed infection in multiple organs. PDN had two times higher neuronal degeneration in the prefrontal cortex, almost eleven times in CA1 and four times in CA3 hippocampus when compared with controls and DFZ group. Astrocytes reactivity was increased in the PDN- and

DFZ-exposed rats compared with controls. The DFZ group showed an average of four times less microglial cells in the three studied regions when compared with controls and the PDN group.

**Conclusions:** It seems that DFZ produced a stronger immunosuppressive effect – systemic and in brain tissue-- than PDN, and induced less neuronal damage than PDN. The preservation of neuronal viability by DFZ suggests that this drug may be more useful for treatment of some autoimmune disorders with SNC involvement.

## **Introducción**

---

### **Historia de los glucocorticoides.**

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 a 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 deficiencia adrenocortical. De esta manera, surgieron dos tipos de hormona adrenocorticales (Goodman y cols., 2001).

### **Glucocorticoides.**

La corteza suprarrenal sintetiza dos clases de esteroides los corticoesteroides (glucocorticoides y mineralocorticoides), los cuales tienen 21 átomos de carbono, y los andrógenos los cuales tienen 19 átomos de carbono. En humanos la hidrocortisona (cortisol) es el glucocorticoide principal (Goodman y cols., 2001).

En respuesta a los cambios y alteraciones concomitantes de la homeostasis, el organismo presenta un gran espectro de reacciones autónomas, endócrinas y comportamentales tendientes para reestablecer la homeostasis. Una característica común de respuesta al estrés es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA) que conduce al incremento del cortisol en el plasma. Esta hormona tiene diversos mecanismos, entre las principales funciones de los glucocorticoides son a nivel del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos, proteínas, balance hidroelectrolítico y participan en la función de los sistemas nervioso, cardiovascular, renal, endocrino e inmunitario así como en el músculo estriado. Además, confieren al organismo la capacidad de resistir a estímulos nocivos y cambios ambientales (DeRijk y cols., 2002).

La hormona del cortisol está regulada bajo el control de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) la cual se origina en la glándula hipofisiaria en un

cambio homeostásico y esta a su vez, está regulada bajo la influencia de la elevación de la hormona reguladora corticotropina (CRH) y la hormona arginin vasopresina (AVP) que son sintetizadas en el hipotálamo. Por otra parte, el hipocampo es una estructura cerebral límbica que está implicada en la adaptación comportamental y ejerce su control inhibitorio bajo estas sustancias. Existe una retroalimentación negativa fuerte en la secreción de ACTH, CRH ejercida por el cortisol a nivel del hipotálamo y la hipófisis (de Kloet y cols., 1997; Meijer y cols., 1998).

### **Mecanismo de acción de los glucocorticoides.**

Los glucocorticoides se absorben a través del tracto gastrointestinal. Se distribuyen rápidamente por todos los tejidos del cuerpo, estos metabolitos circulan unidos a una globulina transportadora que es una proteína, la cual se le conoce como transcortina. El mecanismo de acción de los glucocorticoides implica su difusión pasiva a través de la membrana celular uniéndose al receptor protéico soluble intracitoplasmático. El complejo-hormona receptor penetra en el núcleo y regula la transcripción de genes. De esta forma disminuye la síntesis de moléculas proinflamatorias como citocinas, interleucinas y proteasas, incrementando la síntesis de moléculas como la lipocortina. Estas hormonas se metabolizan principalmente en el hígado y en el riñón, excretándose en la orina. El lento metabolismo de los esteroides y su baja capacidad de unión a la globulina sostiene su acción de forma intensa (Goodman y cols., 2001).

### **Receptores a glucocorticoides.**

El cortisol ejerce sus efectos por medio de dos receptores intracelulares, los cuales se unen directamente al adenosin difosfato (DNA) o interactúan con otros factores transcripcionales en el núcleo. En el cerebro se encuentran dos receptores: los receptores a mineralocorticoides (MR) y receptores a glucocorticoides (GR) (Tanaka y cols., 1997). Ellos permiten en el modo pro-activo

la expresión de un comportamiento en particular dirigido o limitado a una alteración homeostásica, un ejemplo de este modo pro-activo de actuar es el rol de los corticoides en la sincronización y coordinación de los eventos circadianos tales como la ingesta de alimentos y los eventos relacionados con el sueño. En el modo reactivo ellos facilitan la recuperación de la homeostasis después del estrés, por ejemplo, bajo estas condiciones la hormona promueve el almacenamiento de la información que puede ser recuperada en el apropiado contexto en orden a cubrir en el próximo encuentro que modifique la homeostasis (de Kloet y cols., 1999; de Kloet y cols., 1998). En caso de un cambio inmunológico, el concomitante incremento del cortisol en el plasma no solo retiene potencialmente el daño de la respuesta inflamatoria si no también al mismo tiempo alarga la eficacia de la respuesta inmune (Wilckens y cols., 1997).

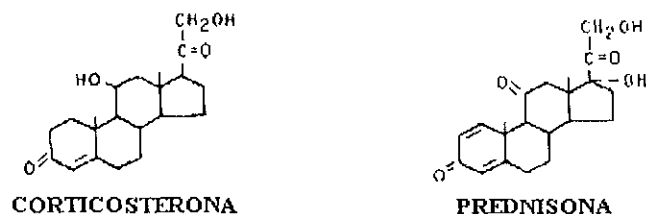
### **Glucocorticoides sintéticos.**

Para disminuir los efectos indeseables de los glucocorticoides se ha tratado de modificar la estructura bioquímica de los glucocorticoides naturales, pero tratando de preservar su efecto anti-inflamatorio y además, reducir la retención de sodio, hiperglicemia y el catabolismo del metabolismo del hueso (Coirini y cols., 1994). Este tipo de sustancias son consideradas parte fundamental en el tratamiento de enfermedades con componente autoinmune (Bumpas y cols., 1993). Los glucocorticoides sintéticos más utilizados son: prednisona, dexametasona, prednisolona, betametazona, triamcinolona y deflazacort (Goodman y cols., 2001).

### **Prednisona.**

La  $\Delta^1$ -cortisona también llamada prednisona ( $C_{21}H_{26}O_5$ ), es uno de los glucocorticoides sintéticos más conocidos y utilizados en la práctica clínica. Este fármaco tiene un grupo pregnano y 21 átomos de carbono en su estructura como se puede observar en la figura 1, por lo cual resalta por su gran potencia antiinflamatoria y capacidad inmunosupresora, por tal motivo se prescribe para

una gran variedad de enfermedades con un componente de origen autoinmune o como terapia hormonal sustitutiva (Cooper y cols., 1990).



**Figura 1.** F6rmula qu6mica del glucocorticoide natural corticosterona y de su an6logo prednisona.

La prednisona, atraviesa con gran facilidad la barrera hemato-encef6lica (Chen y cols.,1996), y una vez dentro de las c6lulas se une reversiblemente a unas prote6nas oligom6ricas intracelulares, denominadas receptores esteroideos (Kubli y cols., 1993), con ellas conforma un complejo esteroide-receptor de alta afinidad. Este f6rmaco produce diversos efectos colaterales por su administraci6n, evidencias cl6nicas sugieren que la prednisona induce alteraciones a nivel del SNC provocando da1o cerebral: muerte neuronal y reactividad de microglia y astrocitos traduci6ndose en disfunci6n cognoscitiva como alteraci6n de memoria (Ramos-Remus y cols., 2002; Schmidt y cols., 1999).

### **Deflazacort.**

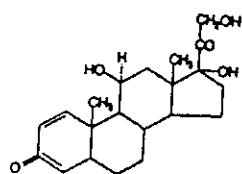
En 1969 Nathanson y colaboradores modificaron la estructura de la prednisolona agregando un grupo oxazol6nico dando como resultado nuevos glucocorticoides como el Deflazacort (Figura 2).

Se ha dicho que este derivado oxazol6nico posee propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras m6s potentes que otros glucocorticoides (Schiantti y cols., 1980). Despu6s de ser administrado por v6a oral, se absorbe y es transportado r6pidamente al interior de las c6lulas y en el h6gado el deflazacort es desacetilado en la posici6n 21, para formar 21-hidroxi-deflazacort (componente activo) forma en la cual ejerce sus efectos farmacol6gicos (Markham y cols., 1995).

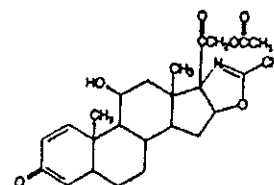


La vida media de este fármaco es de 6, 11 y 18 horas en rata, perro y humano respectivamente. Existen otros metabolitos que son excretados por la orina después de la transformación del deflazacort los cuales se pueden observar en la figura 3. Los metabolitos II y III son los metabolitos urinarios más importantes en la rata, perro y humano. El metabolito V es importante en la orina del humano y los metabolitos I y IV son los menos abundantes en la orina de todas las especies. En general se puede mencionar que la farmacocinética de este fármaco es similar en las tres especies (Martinelli y cols., 1979; Assandri y cols., 1982).

Este glucocorticoide sintético parece tener mejor perfil de seguridad que la prednisona (Messina y cols., 1992), y puede tener menores efectos colaterales



**PREDNISOLONA**



**DEFLAZACORT**

**Figura 2.** Fórmula bioquímica del glucocorticoide sintético deflazacort y de su precursor prednisolona.

sobre la absorción del calcio intestinal, excreción del calcio urinario (Caniggia y cols., 1981), retraso en el crecimiento en niños, ganancia de peso (Bonifati y cols., 1999) y desarrollar menos cataratas subcapsulares.

En general, el deflazacort parece tener menos efectos que la prednisona, en parámetros que pueden ser asociados con el desarrollo de inducción de osteoporosis secundaria a corticoides (Markham y Bryson cols., 1995). Coirini y colaboradores encontraron en 1994, que el deflazacort se distribuye de una manera similar que la dexametasona en el SNC. Se une predominantemente a receptores GC en corteza prefrontal e hipocampo.

### **Glucocorticoides y celularidad cerebral.**

La función del SNC esta dada principalmente por las propiedades de excitabilidad eléctrica de las neuronas; sin embargo las células gliales, a pesar de que no son excitables, también realizan numerosas funciones de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis intracraneal. Los cambios histológicos que resultan ante cualquier daño químico o traumático sobre el tejido nervioso se caracterizan por la aparición de cambios degenerativos neuronales y la reactividad de células no excitables denominadas células gliales como son los astrocitos y la célula de microglia.

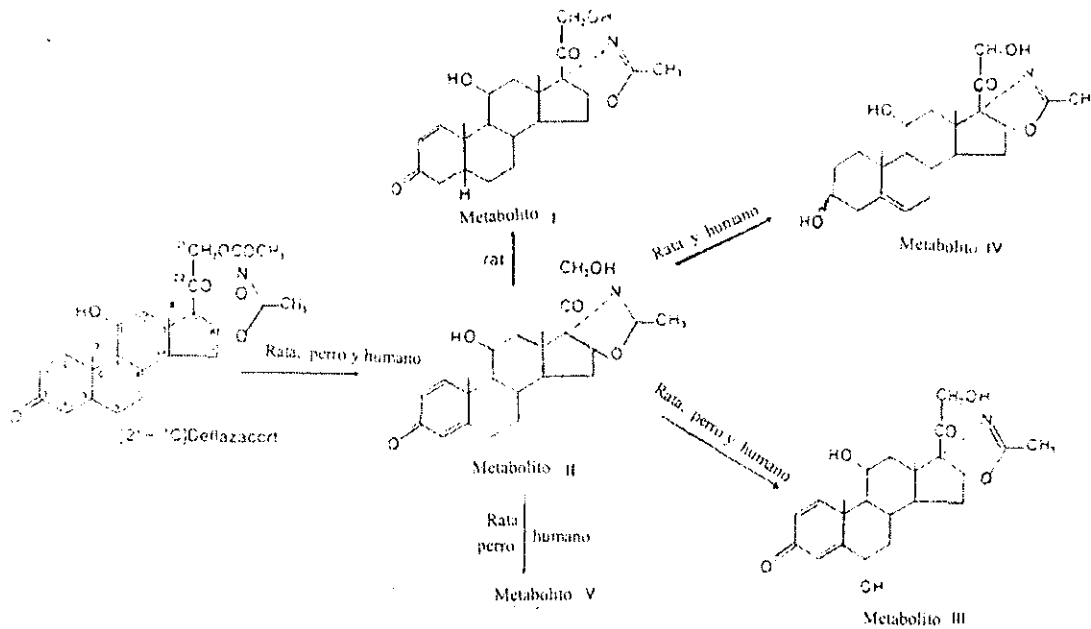


Figura 3. Principales metabolitos del Deflazacort.

### Neuronas.

A nivel neuronal, los cambios que se observan en las neuronas cuando existe daño son: retracción del soma neuronal, picnosis nuclear, desaparición del nucleolo y pérdida de la sustancia de Nilss, con intensa eosinofilia del citoplasma.

Además puede suceder atrofia y degeneración neuronal, donde ocurre una pérdida de neuronas asociada con gliosis reactiva (Banati y cols., 1993). La función y la supervivencia neuronal requieren de la comunicación bidireccional entre las neuronas y las células de la glia que requieren una gran cantidad de factores de crecimiento, estos factores son operacionalmente definidos como proteínas que regulan la supervivencia y diferenciación neuronal. Estas pueden ser sintetizadas por neuronas y células gliales (Unsicker y cols., 2002).

### **Microglia.**

Las células de microglia se encuentran presentes en un 5% al 20% del total de todas las células de la glia a nivel del SNC. La clasificación de las células de la microglia de acuerdo al estado morfológico que se encuentra en el SNC del adulto es el siguiente: Microglia ramificada en estado de reposo o no patológico, microglia reactiva en estado activo las cuales actúan en estados patológicos pero no son fagocíticas y microglia fagocítica que se encuentra establecida en el cerebro como macrófago. Del Rio-Hortega, (1932) quien primero distinguió la célula de microglia de otras células gliales en el SNC, reportó que la transformación de la microglia de un tipo ramificado a un tipo no ramificado era dado en respuesta a un daño cerebral.

### **Cambios morfológicos de la célula de microglia.**

Cuando el cerebro esta dañado o enfermo la microglia ramificada cambia su morfología, hay una retracción en sus prolongaciones y un incremento en su volumen. Esta forma es conocida como microglia activa normalmente o microglia reactiva como se puede observar en la figura 4. Esta transformación de la microglia esta mediada a través de señalizaciones específicas, las moléculas responsables para los cambios morfológicos que han sido explorados en estudios *in vivo*, son: proteínas del plasma, factores de crecimiento, amino-ácidos y

proteínas de la matriz extracelular los cuales modulan los cambios morfológicos de la microglia.



**Figura 4.** Microglia activa.

Por otro lado, las moléculas que transforman la microglia ameboidea a partir de la microglia ramificada han sido determinadas también *in vitro*. Esta célula cuando es cultivada en medios de astrocitos, producen citocinas como son: factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Schilling y cols., 2001). Los substratos gliales tales como son fibronectina, laminina y factor insoluble derivado del astrosito (Tanaka y cols., 1999) causa la ramificación morfológica. Dimetil sulfóxido (DMSO) y ácido retinoico, adenosina trifosfato (ATP), amino-ácidos y vitamina E también inducen ramificaciones. Estas moléculas pueden estar relacionadas con el mantenimiento de la morfología o en el cambio de la microglia activa en su forma ramificada en la regeneración de procesos del SNC. Adenilato ciclasa, calcio y fosfatasa son involucradas en la regulación de las ramificaciones (Kalla y cols., 2003).

#### **Cambios inmunológicos de la célula de microglia.**

Un gran número de estudios inmunohistoquímicos han demostrado que numerosas proteínas incluyendo antígenos de superficie, receptores, y proteína

trombospondina (ECM) son inducidas por una regulación en la actividad de las células de microglia en el sitio del cerebro donde se encuentra el daño cerebral.

Las células presentan proteínas de adhesión las cuáles funcionan en las células leucocíticas algunas de ellas son el antígeno-1 asociado con la función leucocítica (LFA-1), y la ECM las cuales son reguladas en la actividad de la célula de microglia (Moneta y cols., 1993, Moller y cols., 1996). Estas moléculas pueden estar asociadas con contacto celular o reconocimiento celular. Una de las lectinas es reconocida por isolectina B4 derivado de *Griffonia simplicifolia* que esta presente en una gran cantidad de especies, la unión indica un incremento en la actividad de la célula de microglia (Streit y cols., 1989).

ED-1 es un marcador de células fagocíticas, y su activación es inducida también cuando la célula de la microglia activa es transformada en célula fagocítica. Los receptores a citocinas son también elevadas en la microglia activa. Todo lo anterior refleja el rol de la célula inmune particularmente en las condiciones de la inflamación crónica (Gebike-Haerter y cols., 2001).

### **Cambios proliferativos de la célula de microglia.**

El aumento del número de células y sus cambios morfológicos pueden ser observados en muchas condiciones patológicas. La actividad proliferativa de las contribuciones de la célula de microglia se refleja en el aumento del número de células alrededor de la lesión cerebral.

La célula de microglia prolifera en respuesta a factores de estimuladores de colonias tales como M-CSF, GM-CSF, y multi-CSF [interleucina-3 (IL-3n)] (Giulian y cols., 1988).

### **Actividad microglial en la muerte celular.**

Cuando hay una lesión en algún nervio, la célula de microglia prolifera, muchas de estas células se encuentran bajo apoptosis con fragmentación de ADN. Esto puede funcionar como un sistema regulatorio que sirve para mantener la población

de la célula de microglia en niveles adecuados en el área de lesión. El ATP ha mostrado inducción de muerte celular en la célula de la microglia por la vía del receptor purinérgico P2X7 (Brough y cols., 2002).

### **Inducción de moléculas citotóxicas de la microglia activa.**

Muchos estudios han reportado que la célula de microglia activa están asociados con la progresión de estados patológicos para producir características de deterioro, en concreto la microglia puede producir una gran variedad de factores citotóxicos *in vitro*. Especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo anión superóxido, radicales hidróxidos y peróxidos de hidrógeno. Oxidos nitrogenados, como son: óxido nítrico (NO), son reactivos que presentan una elevada cantidad de radicales libres (Chao y cols., 1992; Banati y cols., 1993; Aschner y cols., 1999; Yrjanheikki y cols., 1999; Gao y cols., 2002).

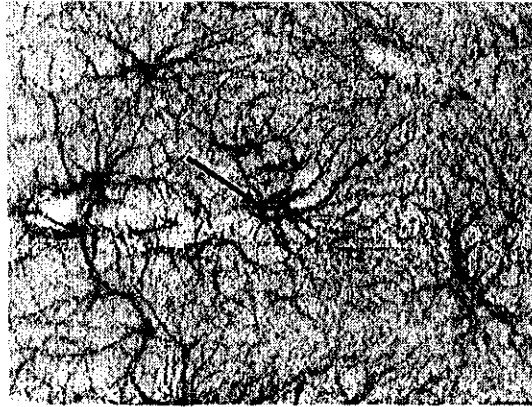
La activación de la microglia es asociada con una variedad de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo Enfermedad de Alzheimer. Finalmente, la microglia estimula también la respuesta astrocitaria, cuya función es regular y limitar la zona de lesión (Gerhmann y cols., 1995).

### **Astrocitos.**

La fisiología de las células gliales bajo condiciones normales o patológicas es de gran importancia en la funcionalidad y estabilidad en el CNS. En general esta idea surge por las investigaciones que señalan que los astrocitos son relativamente resistentes al daño provocado por la isquemia cerebral, deprivación de oxígeno-glucosa (OGD) y del estrés oxidativo (especies de reactivos de oxígeno) (Juurlink y cols., 1997). Recientes trabajos mencionan el significado de la disfunción del astrocito en respuesta al daño y en la muerte celular (Reichert y cols., 2001; Jacobson y cols., 2002; Fern y cols., 1998).

### **Cambios morfológicos del astrocito.**

La morfología de los astrocitos es muy diversa, el soma de las células puede aumentar de tamaño en varios procesos primarios y ontogénicos, de los cuales pueden originarse ramificaciones secundarias. Toda esta diversidad esta relacionada con la interacción funcional y estructural del astrocito con el microambiente cerebral. Ver figura 5.



**Figura 5.** Astrocito Fibroso

#### **Cambios inmunológicos de la célula astrocítica.**

Los astrocitos pueden ser identificados por técnicas inmunohistoquímicas de ciertos antígenos que están restringidos a estas células. Mientras algunas células astrocíticas son inmunopositivas a proteína acidófila fibrilar glial (GFAP) en el cerebro, hay muchos astrocitos que no son marcados con anticuerpo (Ac) anti-GFAP. Algunos Ac. se dirigen a las proteínas citoplasmáticas, (tales como glutamina sintetasa y S-100  $\beta$ ) pueden presentarse como finas manchas imperfectas en el citoplasma (Bushong y cols., 2002).

#### **Actividad astrocítica en la muerte celular.**

Entre las proteínas expresadas por los astrocitos durante la fase aguda de lesión se encuentra la GFAP (Eng y cols., 1988; Reier y cols., 1988). Esta proteína solamente se manifiesta en grandes cantidades durante la respuesta tisular a la

lesión y se mantiene presente por tiempo variable, por esta razón su detección por métodos inmunocitoquímicos se considera un indicador confiable de la activación astrocitaria secundaria a una lesión nerviosa (Topp y cols., 1989; Hozumi y cols., 1990).

### **Astrocito activo y secreción de moléculas neuroprotectoras.**

Las investigaciones recientes han empezado a señalar el efecto de los astrocitos respecto a su habilidad para regular la comunicación neuronal y supervivencia. Factores solubles e insolubles pueden jugar como mediadores en el rol del astrocito como neuroprotector. Recientes trabajos han demostrado que los astrocitos pueden producir factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que es miembro de una superfamilia de estas proteínas, los procesos en los cuales está implicada son: regulación de crecimiento, diferenciación, formación de la matriz extracelular, y regulación inmune así como la inducción de la supervivencia neuronal y la reparación al daño. También recientes estudios han demostrado que la activación de AP-1 un gen de una familia de factores transcripcionales que forman complejos homodiméricos y heterodiméricos pertenecientes a una familia de genes c-Fos y c-Jun, las cuales son moléculas que se requieren para TGF- $\beta$  (Dhandapani y cols., 2003).

### **Interacción del Sistema Nervioso Central y el Sistema Inmunológico.**

La interacción del sistema inmune (SI) y el SNC juegan un importante rol en la modulación de la susceptibilidad del huésped y resistencia a la enfermedad inflamatoria. La regulación neuroendócrina de la respuesta inflamatoria, inmune y en la enfermedad ocurre a múltiples niveles: A nivel sistémico a través de la acción antiinflamatoria de los glucocorticoides activando el eje HPA, localmente a través de la producción de glucocorticoides y la inervación sináptica de órganos inmunes tales como el timo; y en sitios de inflamación. Durante la inflamación, las citocinas del sistema periférico activa al SNC a través de múltiples rutas. Estos resultados



actúan en la estimulación del eje HPA la cual cambia, a través de los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides generalmente van a inhibir la inflamación. Recientemente los estudios indican que los niveles fisiológicos de los glucocorticoides son además inmunomoduladores sumado al efecto inmunosupresor, produciendo citocinas de patrones de TH1- a TH2, en nivel genético. Las intervenciones quirúrgicas y farmacológicas pueden producir resistencia inflamatoria. La activación de este eje HPA, como ocurre durante el estrés, puede también afectar varias enfermedades infecciosas a través de los efectos inmunosupresivos de los glucocorticoides. Esta interacción ha sido claramente demostrada en varios modelos animales, a través de varias especies, tenciones y enfermedades que son también relevantes en las enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunes, incluyendo Artritis reumatoide (AR), Lupus eritematoso sistémico (LES), Síndrome de Sjogren's, Asma alérgica y Enfermedad atópica de la piel. Donde muchos genes y factores ambientales contribuyen a la susceptibilidad y resistencia de enfermedades autoinmunes/inflamatorias (Sternberg y cols., 2001).

### **Antecedentes**

---

Existe cada vez mayor evidencia de que la exposición endógena y/o exógena a glucocorticoides es un determinante neurobiológico del curso y presentación de varios trastornos de la emotividad, disfunción cognoscitiva y daño cerebral. Los glucocorticoides tienen grandes efectos a nivel del SNC y algunos reportes sugieren que el tratamiento con estos fármacos hacen más vulnerable a las neuronas de diferentes regiones cerebrales (McEwen B.S. y cols., 1997). Los pacientes que son tratados con PDN de forma crónica en condiciones neuropsiquiátricas, como son la enfermedad de Alzheimer se han asociado con la alteración en la función del eje HPA (Raber y cols., 1998). Se ha reportado que los niveles altos del cortisol están asociados con disfunción de la memoria en pacientes que presentan síndrome de Cushing y la pérdida del volumen hipocampal (Sapolsky y cols., 2000).

En otras revisiones se ha reportado que en los pacientes con síndrome de Cushing se les realizaron estudios de resonancia magnética al momento de la cirugía en donde se les extirpo la tumoración, el cual era la causante del aumento de los glucocorticoides, y se encontró atrofia hipocampal, un año después se les realizó nuevamente otra resonancia magnética a estos pacientes y se les encontró que el hipocampo regresó nuevamente al tamaño normal (Starkman y cols., 1999). En otro estudio se realizaron pruebas de cociente intelectual (IQ), y los pacientes con mayor número de errores tuvieron síndrome de Cushing (Starkman y cols., 2001). Los pacientes con una historia de abuso sexual durante la infancia presentaron 4.9% mayor atrofia hipocampal izquierda en comparación al grupo control asociando en estos pacientes al estrés y los glucocorticoides (Stein y cols., 1997). En estudios retrospectivos de adultos y niños sugieren que la activación constante del eje HPA está asociada con síndrome del niño maltratado en una edad temprana. Estudios en lactantes y preescolares sugieren que la depresión post-parto y el destete temprano están asociados con presencia de aumento de los niveles de cortisol. Un estudio mostró que la exposición al estrés materno en etapas tempranas sensibilizó a los niños para presentar en posteriores ocasiones respuesta del eje HPA a la exposición subsiguiente a algún evento que les ocasiona estrés (Essex y cols., 2002).

La PDN es el glucocorticoide sintético mas utilizado en la práctica clínica y muchos de sus efectos secundarios son bien conocidos. Sin embargo, sus efectos sobre el SNC son menos reconocidos. Por ejemplo, un estudio realizado por Bender y colaboradores en 1991 en adolescentes con diagnóstico de asma severa crónica que fueron tratados con PDN en un periodo a corto plazo y dosis bajas presentaron síntomas de ansiedad y depresión además de memoria verbal disminuida. Pacientes que recibieron altas dosis de este glucocorticoide presentaron psicosis esteroidea (Hall y cols., 1979). Otro estudio publicó, que pacientes con diferentes patologías entre ellas: LES, dermatomiositis, anemia aplásica entre otras presentaron atrofia cerebral en tomografías computarizadas al parecer subyacente al tratamiento con PDN (Bentson y cols., 1978). En otras publicaciones se realizaron estudios en pacientes sanos que recibieron tratamiento con corticoesteroides exógenos como

prednisona y dexametasona, encontrando disminución de sustancias químicas correlacionadas con la presencia de cambios comportamentales, específicamente en las pruebas que evaluaron tareas de memoria verbal (Wolkowitz y cols., 1994).

Por otro lado, el DFZ es un glucocorticoide sintético del cual se ha reportado un mejor perfil de seguridad que otros glucocorticoides requeridos en la práctica clínica. En tratamientos a corto y a largo plazo parece tener un mejor perfil de seguridad que PDN y metilprednisona en AR (Markham y Bryson; 1995). Los datos disponibles hasta el momento son insuficientes para probar una mayor eficacia del DFZ frente a otros glucocorticoides en patologías como asma severa, LES, entre otras. De igual forma se desconoce sus efectos sobre la celularidad neuronal y glial.

Por otra parte, se ha encontrado que los glucocorticoides endógenos y sintéticos interactúan con la proteína de superficie del HIV, la gp120, exacerbando así los efectos neurotóxicos de este péptido y favoreciendo la aparición del complejo demencial relacionado con Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Brooke y cols., 2000). Se ha reportado también que pacientes con enfermedad de Crohn presentan estados psiquiátricos subclínicos leves y déficits neuropsicológicos selectivos, asociados al tratamiento con esteroides (Snyder y cols., 1994).

Un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, demostró que la administración de PDN 5mg y 80mg implantados en la piel, a dos diferentes grupos durante 8 días, induce trastornos de ansiedad y cambios gliales en las regiones cerebrales con mayor densidad de receptores a glucocorticoides como son la corteza prefrontal y la región CA1 del hipocampo (González-Pérez y cols., 2001). Posterior a este trabajo, en un modelo experimental se investigó los efectos de la administración a largo plazo de 90 días con una dosis moderada de PDN (5 mg). Los resultados obtenidos mostraron que el grupo tratado con PDN en comparación al grupo control presentó en la evaluación del laberinto acuático de Morris trastornos en la fase de adquisición de memoria así como en retención de memoria. El análisis histopatológico del cerebro de rata mostró que el grupo tratado con PDN presentó incremento de la neurodegeneración tanto en la región

de corteza prefrontal y la región CA1 del hipocampo, en los análisis de histoquímica con isolectina B4 e inmunohistoquímica con Ac. monoclonales se observó mayor reactividad glial sugiriendo un efecto negativo de la PDN sobre la disminución de la sobrevivencia neuronal (Ramos-Remus y cols., 2002).

El DFZ es un glucocorticoide sintético relativamente nuevo, el cual tiene menos efectos colaterales que la PDN sobre la glicemia, en el hueso y en el crecimiento en niños (Markham y Bryson; 1995) y tiene una afinidad diferente a RG cerebrales (Coirini y cols., 1994). Por lo tanto, puede ser posible que DFZ pueda inducir menor daño cerebral que PDN después de un largo período de administración. El objetivo de este trabajo fue comprobar si DFZ produce menor efecto sobre la viabilidad neuronal y en la reactividad glial comparado con el grupo de la PDN y el grupo control. Inicialmente se utilizó un modelo experimental semejante a uno utilizado en nuestro laboratorio para analizar daño cerebral provocado por la PDN (Ramos-Remus y cols., 2002), para lo cual se formaron tres grupos (grupo PDN, grupo DFZ y grupo control). Sin embargo, debido a la alta tasa de mortalidad registrada en el grupo de DFZ el modelo fue repetido en cuatro ocasiones. Al final se utilizó únicamente un grupo de DFZ, comparándolo con el grupo control y el grupo de PDN de un estudio publicado previamente (Ramos-Remus y cols., 2002). En los métodos y resultados se describen en detalle estos problemas.

### **Planteamiento del problema**

---

Diversas evidencias indican que la exposición a prednisona en diversos modelos experimentales produce daño neuronal en diversas estructuras cerebrales así como alteración en la ejecución de tareas cognoscitivas. Estos hallazgos pudieran también ocurrir en humanos expuestos a glucocorticoides. El deflazacort, es un nuevo glucocorticoide sintético, que se utiliza en la clínica para el tratamiento de diferentes patologías crónicas, del que se señala posee menos efectos colaterales que la prednisona. En la actualidad no se cuenta con estudios, que establezcan si el deflazacort, causa alteraciones en la citoarquitectura cerebral, de manera similar a lo que hemos reportado con prednisona. Por lo tanto, es de suma importancia

analizar el efecto de la administración crónica del deflazacort sobre el Sistema Nervioso Central ya que podría representar una mejor opción terapéutica para los pacientes que requieren de la administración de los glucocorticoides.

## **Objetivo General**

---

Evaluar los efectos de la exposición crónica de prednisona y deflazacort sobre la estructura neuronal, reactividad astrocitaria y microglial en ratas.

## **Específicos**

- 1.- Cuantificar el daño neuronal en ratas expuestas a deflazacort y prednisona.
- 2.- Cuantificar la reactividad de astrocitos y microglia en ratas expuestas a deflazacort y prednisona.

## **Hipótesis**

---

La administración crónica de deflazacort a ratas tiene un menor efecto en la estructura neuronal, reactividad de microglia y astrocitos en comparación con la prednisona.

## **Materiales y métodos**

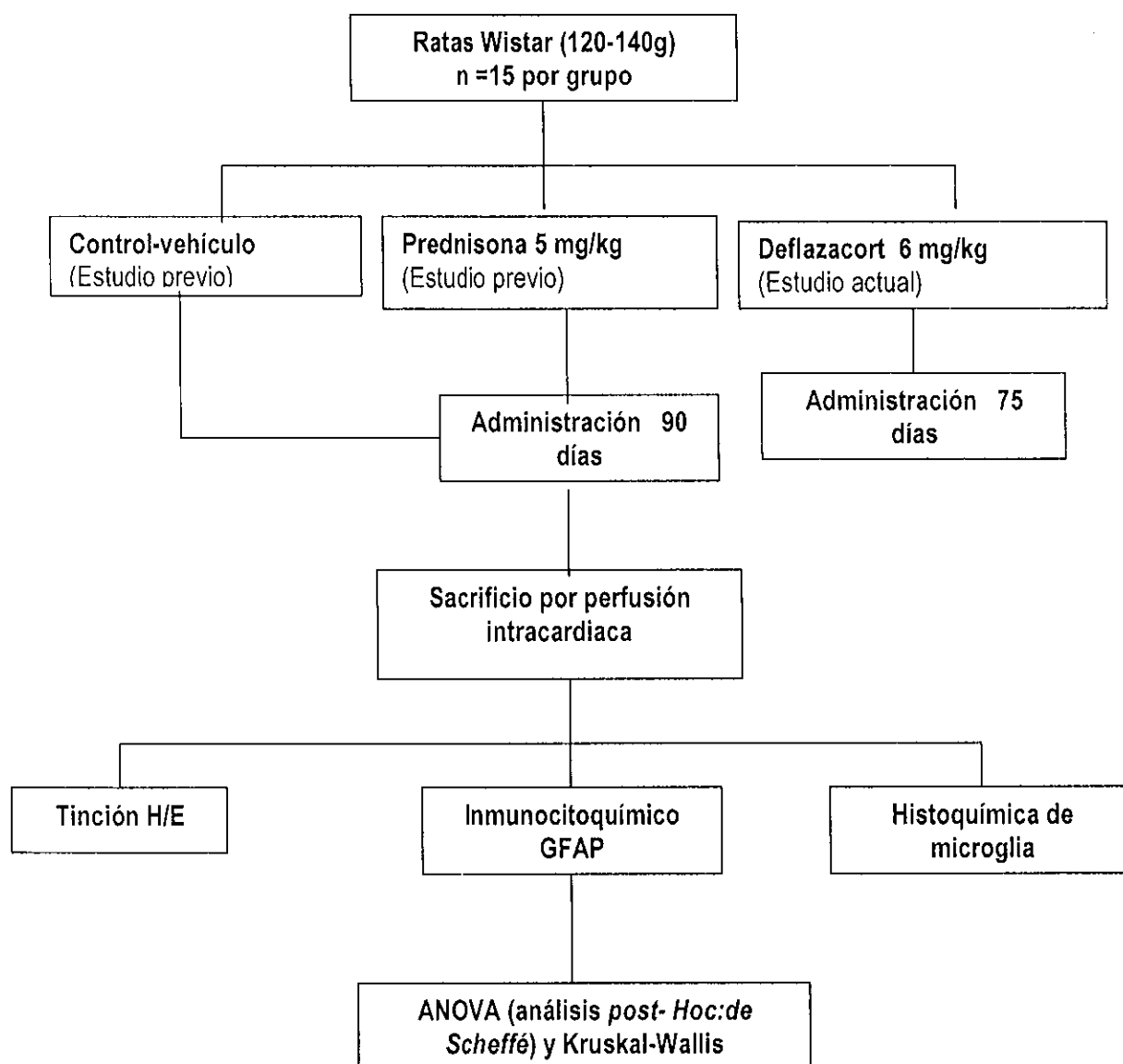
---

### **Grupos experimentales.**

La propuesta original para este estudio fue utilizar un modelo experimental similar a uno que se implementó para probar el efecto de PDN sobre la viabilidad neuronal y gliosis reactiva, la cual fue publicada (Ramos-Remus y cols., 2002). Los experimentos se realizaron en ratas macho Swiss-Wistar de 8 semanas de edad, con un peso de 120-140 g. Todos los animales se mantuvieron a  $22 \pm 1$  °C

con agua y alimento a libre acceso. Para este estudio, se formaron 3 grupos (15 ratas por grupo). El grupo control recibió 0.1 ml de agua destilada por vía oral, cada mañana por 90 días. El grupo de PDN recibió PDN (Chemical Co., St. Louis, Mo) 5mg/Kg/día por vía oral disuelto en 0.1 ml de agua destilada, cada mañana durante 90 días. De acuerdo a un escalamiento esta dosis corresponde a una dosis moderada en humanos (Travis y cols., 1991).

### Diseño experimental.



El grupo de DFZ recibió DFZ (Aventis Pharma, Italia) 6mg/Kg/día por vía oral disuelto en 0.1 ml de agua destilada, cada mañana durante 90 días. La dosis fue la correspondiente al equivalente al grupo de PDN de acuerdo a la literatura (Markham y Bryson; 1995). La manipulación de los diferentes grupos de estudio se realizó por la misma persona, así mismo todos los animales fueron manejados en condiciones similares. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a la guía institucional del cuidado de animales del Centro de Investigación Biomédica de Occidente.

El modelo se llevo a cabo en cuatro ocasiones diferentes. En el cuadro 1 se muestra la mortalidad en cada ocasión. El primer ensayo se detuvo antes de los 70 días de lo planeado inicialmente debido a que se registro un 42% de mortalidad en el grupo de DFZ, provocado por las infecciones de los diferentes órganos de las ratas, inicialmente se pensó que la contaminación fue la causa de la infección, por lo cual en el segundo ensayo se incremento la limpieza del ambiente.

Sin embargo, de nuevo se detuvo el experimento debido al 30 % de mortalidad presentada en el grupo de DFZ al día 32. En un tercer intento se aumento el número de ratas y la limpieza y de nuevo se registró una mortalidad de 42% en este grupo de DFZ, sin embargo en los grupos de PDN y control no hubo mortalidad. Se decidió realizar un cuarto intento en el que solo se utilizó un grupo de DFZ con un mayor número de ratas y bajo condiciones de limpieza profunda (diariamente lavando las cajas, esterilizando y usando agua filtrada). Sin embargo, el 80 % de las ratas murieron y el experimento se detuvo a los 75 días de los 90 días planeados inicialmente. Así solo cuatro ratas fueron utilizadas para el análisis del tejido cerebral.

**Cuadro 1.**

Modelo	Numero de ratas	Ratas sanas	Días de Administración del fármaco	Causa de muerte
1	Control = 14 PDN = 14 DFZ = 14	Control = 14 PDN = 12 DFZ = 8	20 días	Infección
2	Control = 12 PDN = 16 DFZ = 17	Control = 12 PDN = 16 DFZ = 12	32 días	Infección
3	Control = 15 PDN = 15 DFZ = 24	Control = 15 PDN = 15 DFZ = 14	23 días	Infección
4	DFZ = 20	DFZ = 4	75 días	Infección

El cerebro de las cuatro ratas fueron procesados para la obtención de cortes histológicos y el procesamiento inmunocitoquímico e histoquímico. Los cortes fueron comparados con aquellos obtenidos en un estudio previo en donde las ratas fueron expuestas a la misma dosis de PDN o agua en el caso del grupo control por 90 días (Ramos-Remus y cols., 2002). Una lista se genero por computadora al azar en la que se utilizo el 75 % de los cortes obtenidos, cada uno de los cortes del estudio previo y los cortes obtenidos en el presente trabajo con el uso de DFZ fueron codificados a doble ciego y se observaron los diferentes cortes asignados a cada grupo.

#### **Perfusión intracardiaca para fijación del cerebro.**

Las cuatro ratas que fueron elegidas para análisis histopatológico de los diferentes órganos y las otras cuatro que quedaron en el momento de detener el experimento para el análisis del tejido cerebral, los animales fueron sacrificados mediante perfusión intracardiaca, por lo cual las ratas recibieron una dosis subletal



intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) y se les practicó toracotomía amplia para exponer el corazón, se pinzó la arteria aorta descendente; se realizó una incisión en la parte inferior del ventrículo izquierdo, se introdujo un catéter no. 24 y se hicieron pasar 150 ml durante 3 min de una solución lavadora de 0.9% de cloruro de sodio a 37 °C, con 10,000 UI de heparina y 1 gr de procaina/litro, para eliminar el exceso de sangre. Inmediatamente después se pasaron 250 ml de solución fijadora durante 12 min, que contenía paraformaldehído al 4% amortiguado en fosfato de sodio 0.1M y con pH 7.4, al finalizar la perfusión, se practicó craneotomía para extraer el cerebro completo y sumergirlo durante 24 hr. en la misma solución fijadora a 4 °C.

### **Evaluación neuronal.**

Los tejidos cerebrales fueron procesados para realizar el análisis de la población neuronal. Se hicieron cortes coronales con un espesor de 4 µm mediante un microtomo. Los cortes se realizaron a nivel de la corteza prefrontal a partir de bregma 1.2 mm hasta -.26mm. y para la región del hipocampo bregma -3.3mm hasta -4.8mm (Paxinos y Watson; 1986) Ver figura 6. Posteriormente, los cortes se montaron en un portaobjetos, se almacenaron en una estufa a una temperatura de 37°C durante 24 h. En seguida se realizó la técnica convencional de tinción con hematoxilina y eosina para analizar el tejido (García y cols., 1995).

### **Tinción de hematoxilina de Harris y eosina.**

Los tejidos fueron colocados dos veces durante 15 min. en soluciones de xileno en baño María a 50° C: xileno-1 y xileno-2 por 15 min. en cada ocasión, después se transfirieron a otra solución de xileno-3 a temperatura ambiente durante 10 min. enseguida, se pasaron sucesivamente a soluciones de etanol a concentración decreciente (100, 95, 80 y 70%) durante 10 min. c/u, posteriormente, se sumergieron en agua destilada por 3 minutos y acto seguido se inicio la tinción con hematoxilina de Harris (5 min), se realizó un lavado con agua corriente (hasta

retirar el excedente de colorante), posteriormente se pasaron a una solución compuesta con alcohol-ácido (2-5 seg) para decolorar, se realizaron tres lavados mas uno con agua corriente, otro con agua amoniacal (1-2 min) y uno mas con agua corriente, alcohol al 96% (2 min), eosina (1-2 min), alcohol al 100% (2 min) en 3 ocasiones, xileno (5 min). Finalmente se les agregó unas gotas de la resina Entellan (Merck) se colocaron los cubreobjetos y se analizaron con un microscopio de luz a 400x.

### **Análisis cuantitativo neuronal.**

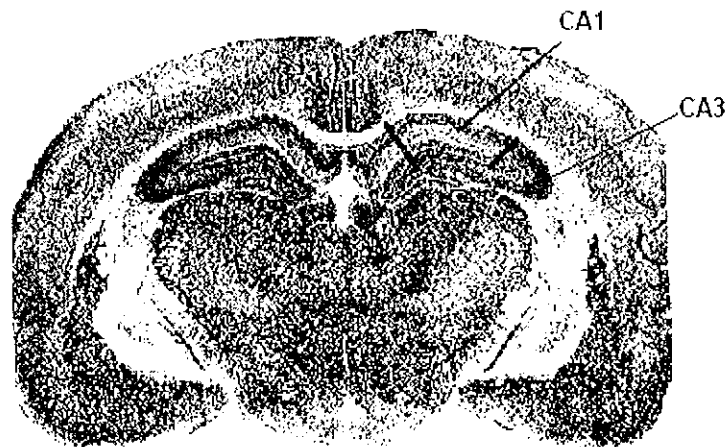
Se realizó la cuantificación de la población total de neuronas presentes en 120 campos/región/rata/grupo a un aumento de 400x, y así mismo se contabilizo la población de neuronas que revelaron cualquier tipo de anormalidades como: basofilia elevada, cariorrexis, cariolisis, vacuolización del citoplasma, edematización de organelos, pérdida de los límites de la membrana perinuclear o la membrana plasmática (García y cols., 1995).

### **Análisis inmunocitoquímico e histoquímica para células de la glia.**

Los tejidos utilizados para identificar las células astrocíticas y de microglia fueron tratados bajo el procedimiento usado en un trabajo previo (Ramos-Remus y cols., 2002). De la misma manera con un microtomo se realizaron cortes coronales de 30  $\mu\text{m}$  de espesor para análisis inmunocitoquímico cuantitativo de astrocitos e histoquímico para las células de microglia.

Para la identificación de astrocitos los Ac. primarios fueron generados en conejo, contra proteína GFAP obtenida de médula espinal bovina (inmunógeno). Para el marcaje histoquímico de las células de microglia utilizamos isolectina-B4 con peroxidasa acoplada proveniente de *Griffonia simplicifolia* que reconoce específicamente glucoproteínas presentes en la membrana de estas células.

Estas dos técnicas han sido extensamente utilizadas para estudios de gliosis reactiva, indicativa de lesión en el tejido nervioso.



**Figura 6.** Corte coronal del cerebro de rata donde se muestran la region 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).

### **Análisis de inmunomarcaje de astrocitos.**

Una vez seleccionados los tejidos se procedió a desactivar peroxidasas endógenas para lo cual se utilizó una solución compuesta de fosfatos salino 0.1 M y un pH. 7.4, con metanol al 10% y peróxido de hidrógeno al 0.3%, durante todo el estudio los Ac. fueron disueltos en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M y un pH 7.3 con albúmina sérica bovina al 0.1% Tritón X-100 al 0.3%. Esta misma solución se utilizó para los lavados intermedios (tres cambios de 15 min) que fueron repetidos a través del estudio entre cada etapa de incubación. Para astrocitos los Ac. primarios fueron utilizados en dilución 1:100 (Dako Z334). La incubación se realizó con movimientos suaves durante toda la noche, a 4 °C, enseguida, se hicieron varios lavados en amortiguador de fosfatos y los tejidos fueron incubados con el Ac. secundario de enlace; fueron IgG generadas en cerdo

contra IgG de conejo en dilución 1:250, la incubación se realizó a temperatura ambiente con movimientos suaves durante 6 hrs. y los tejidos se lavaron nuevamente para luego incubarse en la oscuridad con el complejo PAP de conejo en dilución 1:200 durante 2 hrs. a temperatura ambiente (Dako Z113), el revelado de la reacción se hizo con la utilización de una solución compuesta de 3´3-diaminobencidina al 0.07% y peróxido de hidrógeno al 0.3% y se detuvo entre los 10 y 15 min, cuando se desarrolló una coloración marrón en los tejidos, se detuvo el proceso. Después de lavar en agua destilada los cortes fueron montados sobre porta objetos con resina Entellan (Merck) para su análisis posterior en un microscopio.

#### **Análisis histoquímico para célula de microglia.**

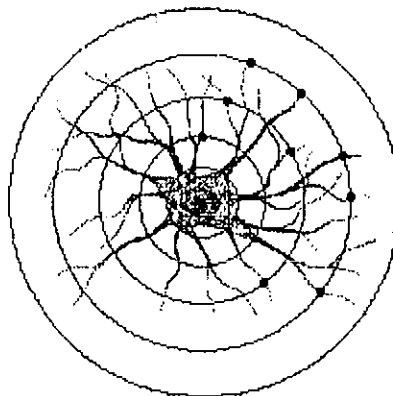
Para el análisis de histoquímico se utilizó isolectina B4 con peroxidasa acoplada (Sigma L2140) en dilución 1:100, inicialmente se inactivaron peroxidases endógenas mediante incubación de los cortes durante 15 min en una solución compuesta de metanol al 10% y peróxido de hidrógeno al 0.3%, se hicieron lavados (2x15 min) en amortiguador fosfato salino 0.1 M, pH 7.4 (PBS), los cortes fueron incubados durante 10 min en una solución catiónica compuesta por CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM, MnCl 0.1 mM disueltos en PBS para aumentar la afinidad de la isolectina con la membrana microglial.

La incubación con isolectina B4 con peroxidasa acoplada (*Griffonia simplicifolia*) en dilución 1:100 se realizó durante toda la noche a 4 °C, en la oscuridad y en movimiento, después de tres lavados con PBS (3x20 min) los cortes fueron incubados a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 4 hrs. en el complejo avidina-biotina (Vector PK-4000); después de lavar los tejidos se reveló la reacción de peroxidasa con la misma solución de diaminobencidina y peróxido de hidrógeno. Los cortes de tejidos fueron montados en portaobjetos para su análisis al microscopio de luz.

### **Análisis morfométrico.**

El análisis morfométrico se realizó mediante microscopía de luz con un analizador de imágenes Leica (QWIN5000I). Los cortes inmunoteñidos fueron analizados a un aumento de 400x, se cuantificó la densidad numérica de microglia y astrocitos en la región CA1 y CA3 del hipocampo y corteza prefrontal. De cada grupo experimental se contabilizaron 120 campos visuales/región/rata por grupo, la cuantificación del número de células se realizó en un mismo plano focal del corte. Cada campo correspondió a  $738,982 \mu\text{m}^2$ .

El análisis de la transformación astrocitaria y microglial, se realizó siguiendo el método de cuantificación de puntos modificados de Weibel (Luquín y cols., 1995). Se analizaron las prolongaciones visibles de las células en un mismo plano focal mediante una rejilla estereológica. La rejilla de Weibel consiste en 5 círculos concéntricos con una distancia en cada círculo de  $89.85 \mu\text{m}$ , en donde el núcleo del astrocito y de la microglia se fijó justo en el centro de la rejilla y se cuantificó el número total de puntos en los que las prolongaciones celulares de los astrocitos interseccionan con las líneas de la rejilla de prueba (Figura 7). La cuantificación se realizó a un aumento de 400x (Weibel y cols., 1979).



**Figura 7.** 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 a un aumento de 400x.

## **Análisis estadístico.**

Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  ES. Las diferencias entre tres variables continuas para los análisis morfológicos fueron determinadas por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los intervalos de confianza (IC) para diferencias son reportadas al 95% (ejem., 95% IC). Se consideraron valores con significancia estadística cuando  $P \leq 0.05$ . La variabilidad intra-observador entre la lectura original y la lectura actual, realizada por el mismo observador, fue 0.71 usando la correlación de Pearson's (Daniel y cols., 1995).

## **Resultados**

---

Se registró una tasa de mortalidad del 49% en el grupo de DFZ, de 4.5% en el grupo de PDN y no se registró mortalidad en el grupo control. Cuatro ratas se enfermaron severamente del grupo DFZ, las cuales fueron sacrificadas para estudio post-mortem, estas ratas no fueron incluidas en el estudio del tejido cerebral. Todos los animales presentaron características histopatológicas similares, focos de infección múltiple en pulmones y riñones. Los pulmones mostraron múltiples abscesos focales asociados con dendritus celulares y necrosis extensiva rodeada por neutrófilos y macrófagos. Los linfocitos fueron encontrados en pequeñas cantidades alrededor de los bronquios. La pleura se adelgazó por proliferación de fibroblastos e hiperplasia mesotelial. Los riñones también mostraron múltiples abscesos focales en corteza y médula, con una necrosis extensa rodeada por neutrófilos, histiocitos y necrosis tubular aguda. La medula espinal mostró hiperplasia granulocítica (celularidad media del 98%). El hígado mostró severa y amplia dilatación sinusoidal. Dos de estos animales también presentaron esteatosis centrolobular de pequeñas gotas. Uno de estos animales mostró múltiples abscesos involucrando músculo esquelético, hueso y tejido celular subcutáneo. El análisis bacteriológico demostró que *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Streptococcus viridans* son los principales patógenos. Los niveles de sodio en suero estuvieron entre los límites normales en todas las ratas estudiadas

y aun así la glucosa en suero fue de 1.6 veces arriba de lo normal en el grupo de DFZ.

### Evaluación del índice de neurodegeneración.

El daño neuronal, se evaluó por el índice de neurodegeneración mostrado en el cuadro 2. El grupo de PDN presentó un índice de neurodegeneración dos veces mayor en la corteza prefrontal (95% IC por diferencias entre los grupos control y PDN de 2.1 a 3.9, y entre los grupos de PDN y DFZ de 2.4 a 4.8) casi once veces más en la región CA1 del hipocampo (95% IC de diferencias entre los grupos de PDN y control 3.2 a 4.5, y entre los grupos de PDN y DFZ de 2.8 a 4) y cuatro veces en la región CA3 del hipocampo (95% IC de diferencias entre los grupos de PDN y control 0.65 a 1.32, y entre los grupos de PDN y DFZ de 0.47 a 1.08), cuando se compararon el grupo control y el grupo de DFZ. No se registraron diferencias significativas entre el grupo de DFZ y el grupo control en ninguna de las tres regiones analizadas.

### Cuadro 2. Índice de neurodegeneración.

	Grupo Control	Grupo PDN	Grupo DFZ	P
Corteza Prefrontal	3 ± 0.23 (2.6 a 3.6)	6 ± 0.27 (5.6 a 6.7)*	2.6 ± 0.3 (2 a 3.1)	< 0.001 *
Hipocampo CA1	0.4 ± 5.8 (0.3 a 0.5)	4.3 ± 0.22 (3.8 a 4.7) *	0.8 ± 0.11 (0.6 a 1.0)	< 0.001 *
Hipocampo CA3	0.3 ± 6.7 (0.15 a 0.4)	1.3 ± 0.12 (1.0 a 1.5) *	0.5 ± 5.6 (0.37 a 0.6)	<0.001*

\*Diferencias significativas para el grupo de PDN.

El índice de neurodegeneración fue arbitrariamente categorizado en ninguna, leve, moderada y severa basada en la distribución de cuarteles (Cuadro 3). El grupo de PDN mostró dos veces mas degeneración severa en la corteza prefrontal, casi diez veces mas degeneración severa en la región CA1 del hipocampo y cinco veces mas en la región CA3 del hipocampo comparado con los controles (p<0.001). Se observo menos degeneración en el grupo de DFZ.



**Figura 8.** Neuronas de la región CA3 del hipocampo de rata. **A.** Morfología normal, del grupo control; las neuronas aparecen redondeadas con citoplasma discretamente basófilo núcleos prominentes con cromatina dispersa y nucleolos bien definidos. **B.** El grupo PDN, presenta un patrón típico de degeneración neuronal, el parénquima cerebral presenta pérdida a 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. **C.** Morfología casi normal del grupo DFZ se observan algunas células con datos de neurodegeneración. Tinción con hematoxilina y eosina; barra 25  $\mu\text{m}$ .

#### **Análisis inmunocitoquímico de astrocitos.**

Los resultados del análisis morfométrico de astrocitos son ilustrados en el cuadro 4. La reactividad inmunocitoquímica de estas células fue aumentada en el tejido cerebral de las ratas expuestas a DFZ y PDN en comparación con el grupo control. En la corteza prefrontal y en la región CA1 del hipocampo el número de astrocitos fue significativamente mayor en ambos grupos de PDN y DFZ en comparación con el grupo control, pero en la región CA3 del hipocampo solamente se registraron diferencias significativas en el grupo de DFZ comparado con el grupo control y el grupo de PDN. El mismo patrón fue observado en las intersecciones citoplasmáticas en las tres regiones cerebrales evaluadas.



**Cuadro 3. Frecuencia de distribución por cuartiles del índice de neurodegeneración.**

Grado de degeneración	No. (%)		
	Grupo Control	Grupo PDN	Grupo DFZ
<b>Corteza Prefrontal</b>			
Ninguna	339 (57)	218 (31)	131 (59)
Leve	36 (6)	9 (1)	1 (0.5)
Moderada	74 (12.5)	100 (14)	23 (10)
Severa	143 (24)	381 (54)	67 (30)
<b>Hipocampo CA1</b>			
Ninguna	371 (90)	350 (52.5)	394 (88)
Leve	2 (0.5)	1 (0.1)	0
Moderada	22 (5)	34 (5)	9 (2)
Severa	19 (5)	282 (42)	46 (10)
<b>Hipocampo CA3</b>			
Ninguna	542 (96)	694 (82.5)	707 (90)
Leve	1 (0.2)	0	1 (0.1)
Moderada	5 (0.9)	57 (7)	38 (5)
Severa	16 (3)	90 (11)	39 (5)

<sup>a</sup>Distribución de cuarteles del índice de neurodegeneración por campo de cada región cerebral.

### **Análisis histoquímico de células de microglia.**

El cuadro 5 muestra el número de células microgliales marcadas con isolectina B4 y el número de intersecciones citoplasmáticas registradas en estas células en las regiones analizadas. El grupo de PDN tuvo un número significativamente mayor de células microgliales marcadas en la corteza prefrontal (95% IC de diferencias 2.8 a 4.5) y en la región CA3 del hipocampo (95% IC de diferencias 2.6 a 4.4) comparado con el grupo control. Por otro lado, el grupo de DFZ mostró un promedio de cuatro veces menor de células microgliales en las tres regiones estudiadas cuando se comparan con el grupo control y el grupo de PDN (95% IC de diferencias entre DFZ y controles -9.9 a -8.2 en corteza prefrontal, -14 a -12.9

en la región CA1, y  $-9$  a  $-7.3$  en la región CA3 de hipocampo). Las transformaciones citoplasmáticas microgliales fueron evaluadas por el número de intersecciones, fueron significativamente mas bajas en ambos grupos de PDN y DFZ comparados con los controles.

**Cuadro 4. Análisis de la población astrocítica inmunoreactiva a la proteína acidifica fibrilar glial.**

	Media $\pm$ ES (95% IC)			P
	Grupo control	Grupo PDN	Grupo DFZ	
<b>Astroцитos por campo</b>				
Corteza Prefrontal	16 $\pm$ 0.4 (15.5 a 17)	24 $\pm$ 0.4 (23 a 25)	27 $\pm$ 0.5 (26 a 28)	<0.001**
Hipocampo CA1	14 $\pm$ 0.4 (13 a 15)	21 $\pm$ 0.5 (20 a 22)	29 $\pm$ 0.8 (28 a 31)	<0.001**
Hipocampo CA3	24 $\pm$ 1 (22 a 26.5)	25 $\pm$ 0.5 (24 a 26)	49 $\pm$ 0.8 (47 a 50.5) <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>
<b>No. De intersecciones</b>				
Corteza Prefrontal	10 $\pm$ 0.2 (9 a 10)	15 $\pm$ 0.3 (15 a 16)	18 $\pm$ 0.3 (18 a 19)	<0.001**
Hipocampo CA1	11 $\pm$ 0.3 (11 a 12)	19.5 $\pm$ 0.4 (18 a 20)	22 $\pm$ 0.4 (22 a 23)	<0.001**
Hipocampo CA3	16.5 $\pm$ 0.6 (15 a 18)	17 $\pm$ 0.4 (16 a 18)	23 $\pm$ 0.4 (22 a 24) <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>

\*\*Diferencia significativa entre los tres grupos.

<sup>a</sup>Diferencias significativas para el grupo DFZ.

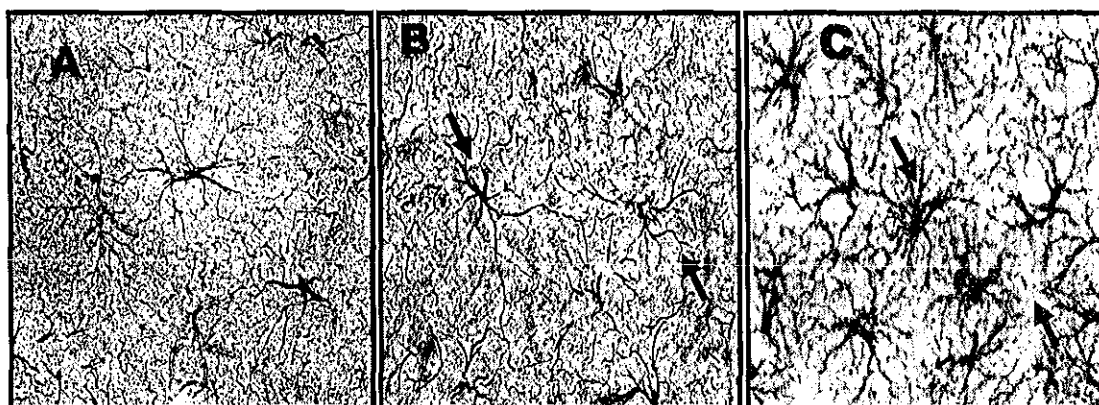


Figura 9. Células Astrocitarias de la región CA3 de hipocampo de rata del grupo DFZ, PDN y control. **A.** Morfología normal del astrocito en donde observamos una población y prolongaciones citoplasmáticas normales. **B.** En el grupo de PDN se observa mayor cantidad de astrocitos y más ramificaciones en comparación al grupo control. **C.** En el grupo DFZ se observa mayor población y mayor cantidad de prolongaciones citoplasmáticas en comparación al grupo control y al grupo PDN.

**Cuadro 5. Análisis de la población microglial marcada con isolectina-B4.**

	Media $\pm$ ES (95% IC)			P
	Grupo Control	Grupo PDN	Grupo DFZ	
<b>Microglia por campo</b>				
Corteza Prefrontal	12 $\pm$ 0.2 (11.6 a 12.8)	16 $\pm$ 0.3 (15.2 a 16.5)	3 $\pm$ 0.1 (2.8 a 3.3)	<0.001**
Hipocampo CA1	17 $\pm$ 0.2 (16.4 a 17.6)	16 $\pm$ 0.2 (15.6 a 16.8)	3 $\pm$ 0.1 (3.1 a 3.6) <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>
Hipocampo CA3	12 $\pm$ 0.3 (11.5 a 12.7)	16 $\pm$ 0.3 (15 a 16.3)	4 $\pm$ 0.2 (3.5 a 4.2)	<0.001**
<b>No. de intersecciones</b>				
Corteza Prefrontal	10 $\pm$ 0.2 (9.6 a 10.3)	5.5 $\pm$ 0.1 (5.2 a 5.8)	9 $\pm$ 0.2 (7.5 a 8.5)	<0.001**
Hipocampo CA1	13 $\pm$ 0.2 (12.5 a 13.5)	8 $\pm$ 0.2 (7.3 a 8.2)	9.5 $\pm$ 0.2 (9.1 a 9.8)	<0.001**
Hipocampo CA3	12 $\pm$ 0.2 (11.6 a 12.7)	8 $\pm$ 0.3 (7.4 a 8.5)	10 $\pm$ 0.1 (9.8 a 10.4)	<0.001**

\*\* Diferencias significativas entre los tres grupos

<sup>a</sup>Diferencias significativas para el grupo de DFZ.



**Figura 10.** Corte histológico de hipocampo CA3 de rata, histoquímica para marcaje de células de microglia. **A.** En el grupo control se observa la microglia en reposo, con citoplasma y ramificaciones prominentes. **B.** En el grupo PDN, se observa la microglia en forma ameboidea (prolongaciones citoplasmática pequeñas) que es la forma fagocítica de la célula de microglia. **C.** En el grupo DFZ, se observa en el campo la microglia de forma escasa y con citoplasma y prolongaciones prominentes.

## Discusión

---

Varios estudios clínicos y experimentales han demostrado que la PDN daña el funcionamiento cognitivo y las estructuras cerebrales, incluyendo la viabilidad neuronal (Ramos-Remus y cols., 2002). Por otro lado, el DFZ es un glucocorticoide sintético el cual es promovido por tener un bajo riesgo de efectos colaterales tal como la pérdida de hueso, intolerancia a la glucosa o síndrome de Cushing que otros esteroides disponibles, por lo que se quiso probar la hipótesis de que el DFZ produce menor daño cerebral que PDN, utilizando un modelo similar al que nosotros usamos antes (Ramos-Remus y cols., 2002).

Sin embargo, la alta cantidad de mortalidad en el grupo de DFZ fue inesperada, las infecciones fueron las causas de muerte. Existen dos posibles explicaciones: contaminación primaria en el manejo de las ratas o un efecto inesperado de DFZ. Se pensó que la contaminación no fue la causa, porque las infecciones ocurrieron repetidamente en los cuatro ensayos evaluados en diferentes tiempos en el grupo DFZ, pero no en los grupos de PDN y control, aunque fueron manejados en el mismo ambiente y limpieza. La otra explicación podría ser que el DFZ produce un efecto inesperado en las ratas a través de los diferentes metabolitos del fármaco o su potencia para provocar inmunosupresión.

Se ha reportado que los metabolitos y la farmacocinética del DFZ no es diferente en ratas, en el perro o en el hombre (Martinelli y cols., 1979), por lo que es improbable que las ratas metabolicen el DFZ de diferente forma a los humanos. La otra posibilidad es que DFZ produce una inmunosupresión mayor que la PDN, el DFZ es una oxazolina que es un derivado de la prednisolona con efectos similares y se describe al menos un 25 % de menor potencia que PDN, usualmente es administrada en dosis proporcionalmente altas. La equivalencia de la dosis permitida para PDN es 1:1.2 (PDN 5mg=DFZ 6mg) (Markham y Bryson; 1995) y esta equivalencia fue la usada para este estudio. Sin embargo, un reporte mostró que el efecto de DFZ en la respuesta inmune es similar en magnitud a la PDN, pero sustentada por un período mucho más largo (Scudeletti y cols., 1984). En otro estudio se encontró que el DFZ puede ser 10 veces más potente que la

prednisolona para inhibir la formación de tejido de granulación en un modelo experimental con un pelet de algodón como granuloma (Schiatti y cols., 1980). En modelos experimentales de reacciones alérgicas, los efectos inhibitorios de DFZ fueron más fuertes que los de la PDN, al parecer la potencia o el efecto prolongado del DFZ produce una inmunosupresión mas fuerte en estas ratas y por consecuente una infección y posteriormente la muerte.

Se repitió en cuatro ocasiones diferentes el modelo experimental debido a la alta mortalidad entre las ratas que recibieron DFZ. Se decidió realizar un cuarto ensayo usando solamente el grupo de DFZ. El estudio se paro el día 75, donde solamente cuatro ratas quedaron sanas. Los cerebros de estas cuatro ratas fueron procesados y analizados. Los cortes de este último estudio se compararon con los cortes de los grupos de otro estudio que fue previamente publicado que incluyó los grupos control y el de PDN los cuales siguieron un proceso similar (Ramos-Remus y cols., 2002).

Se trató de minimizar los sesgos a través de una selección al azar de los cortes de tejido cerebral obtenidos del previo estudio (Grupos de PDN y control) y el estudio actual (Grupo de DFZ), fueron codificados a doble ciego y se observaron los diferentes cortes asignados a cada grupo. Así la influencia del proceso de los tejidos realizados a diferentes tiempos en los resultados no pudo ser prevista. La variabilidad intra-observador entre las lecturas originales y las nuevas lecturas fueron realizadas por el mismo observador.

De acuerdo a lo anterior, los resultados mostraron que PDN también induce cambios patológicos en la región CA3 de hipocampo provocando mayor neurodegeneración, y potenciando la reactividad de GFAP e incrementando el número de células marcadas con isolectina-B4, con una reducción en sus ramificaciones (predominando la microglia fagocítica). En contraste, los presentes descubrimientos mostraron que la sobrevida neuronal en las mismas regiones no fue modificada por la administración de DFZ. Este fenómeno puede ser debido a la pobre afinidad de DFZ a los RG comparado con PDN (Coirini y cols., 1994). El pobre acoplamiento entre el receptor y el agonista puede aumentar la captura de glucosa dentro de las neuronas. La reducción en la captura de glucosa esta

directamente relacionada con el daño neuronal (Horner y cols., 1990). De hecho, la hiperglicemia en suero puede ser neuroprotectora y esto puede parcialmente explicar los resultados (Kraft y cols., 1990).

La cuantificación de la reactividad astrocítica mostró que DFZ aumenta significativamente la inmunoreactividad de GFAP en la corteza prefrontal, en la región CA1 y en la región CA3 del hipocampo cuando fueron comparados con los grupos de PDN y el control. Algunos reportes recientes sugieren que el incremento de la actividad astrocítica es benéfico para la supervivencia neuronal por aumento de la activación de TFG-beta y c-Jun/AP-1 (Dhandapani y cols., 2003). Sin embargo, nosotros sugerimos que la reducción de la neurodegeneración puede también estar relacionada con el aumento de la expresión de GFAP como se observó en la reactividad astrocítica en el grupo de DFZ, pero se requieren de la realización de nuevos estudios para esclarecer el rol de los astrocitos en la supervivencia neuronal.

Los resultados mostraron que el DFZ modifica el número y transformación citoplasmática de células microgliales reduciendo notablemente la población microglial y aumentando su grado de ramificación (predominancia de microglia en reposo o ramificada). La inhibición de la actividad microglial reduce la citotoxicidad producida por estas células (Drew y cols., 2000), consecuentemente, el DFZ asociado a la inhibición microglial puede ser neuroprotectora. En adición, el efecto inmunosupresor de DFZ sobre la población de microglia puede indirectamente estar reflejando una inmunodeficiencia sistémica, el cual predispone a infecciones y explica la alta incidencia de sepsis en las ratas expuestas a DFZ.

Así los presentes descubrimientos y algunos reportes previos (Scudeletti y cols., 1984; Omote y cols., 1994) sugieren fuertemente que DFZ induce un importante efecto inmunosupresor sobre la inmunidad celular. De hecho, se estima que la potencia entre los glucocorticoides usados para las prescripciones clínicas son imprecisas debido a que ellos se basan en su capacidad para suprimir el eje HPA y la unión por su afinidad a RG y por lo tanto no reflejan totalmente el efecto inmunosupresor de los glucocorticoides (Millar y cols., 2002). De acuerdo a lo anterior, los hallazgos sugieren que el DFZ en terapias a largo plazo pudiera ser

prescrito como una alternativa terapéutica para enfermedades de origen autoinmune.

## **Conclusiones**

---

- 1.- Parece ser que DFZ produce un fuerte efecto inmunosupresor a nivel sistémico, cerebral y subsecuentemente menor daño cerebral cuando se compara con PDN.
- 2.- La preservación de la viabilidad neuronal por DFZ sugiere que esta droga puede ser útil para el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes con afectación del SNC (tal como el LES).

## **Bibliografía**

---

- Aschner M, Allen JW, Kimelberg HK, LoPachin RM, Streit WJ.** Glial cells in neurotoxicity development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:151-73.
- Assandri A, Omodei-Sale A, Galliani G.** A new class of non-hormonal contragestational agents: pharmacodynamic-pharmacokinetic relationships. *Q Rev Drug Metab Drug Interact* 1982;4(2-3):237-61.
- Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW.** Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993;7(1):111-8.
- Bender BG, Lerner JA, Poland JE.** Association between corticosteroids and psychologic change in hospitalized asthmatic children. *Ann Allergy* 1991;66(5):414-9.
- Bentson J, Reza M, Winter J, Wilson G.** Steroids and apparent cerebral atrophy on computed tomography scans. *J Comput Assist Tomogr* 1978;2(1):16-23.

**Bonifati MD, Ruzza G, Bonometto P, Berardinelli A, Gorni K, Orcesi S, Lanzi G, Angelini C.** A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2000;23(9):1344-7.

**Brooke SM, Sapolsky RM.** The effects of steroid hormones in HIV-related neurotoxicity: a mini review. *Biol Psychiatry* 2000;48(9):881-93.

**Brough D, Le Feuvre RA, Iwakura Y, Rothwell NJ.** Purinergic (P2X7) receptor activation of microglia induces cell death via an interleukin-1-independent mechanism. *Mol Cell Neurosci* 2002;19(2):272-80.

**Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH.** Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 2002;22(1):183-92.

**Bumpas D.** Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 1993;119: 1198-208.

**Caniggia A, Nuti R, Lore F, Vattimo A.** Pathophysiology of the adverse effects of glucoactive corticosteroids on calcium metabolism in man. *J Steroid Biochem* 1981;15:153-61.

**Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK.** Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 1992;49(8):2736-41.

**Chen TC, Mackic JB, McComb JG, Giannotta SL, Weiss MH, Zlokovic BV.** Cellular uptake and transport of methylprednisolone at the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 1996;38(2):348-54.

**Coirini H, Flores D, Vega MC, Gonzalez Deniselle MC, De Nicola AF.** Binding of the anti-inflammatory steroid deflazacort to glucocorticoid receptors in brain and peripheral tissues. In vivo and in vitro studies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994;49(1):43-9.

**Cooper C, Kirwan JR.** The risks of local and systemic corticosteroid administration. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1990 Aug;4(2):305-32.

**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.



**del Rio-Hortega P. Microglia.** In: **Penfield W.**, ed. *Cytology and –Cellular Pathology of the Nervous System.* New York: Hocker, 1932; 2: 481-534.

**Dhandapani KM, Hadman M, De Sevilla L, Wade MF, Mahesh VB, Brann DW.** Astrocyte protection of neurons: role of transforming growth factor-beta signaling via a c-Jun-AP-1 protective pathway. *J Biol Chem* 2003;278(44):43329-39.

**Drew PD, Chavis JA.** Inhibition of microglial cell activation by cortisol. *Brain Res Bull* 2000;52(5):391-6.

**de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M.** Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 1999;22(10):422-6.

**De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M.** Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev.* 1998;19(3):269-301.

**de Kloet ER.** Behavioral and neuroendocrine responses controlled by the concerted action of central mineralocorticoid (MRS) and glucocorticoid receptors (GRS). *Psychoneuroendocrinology* 1997; 22 suppl 1: 87-93.

**DeRijk RH, Schaaf M, de Kloet ER.** Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;81(2):103-22.

**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.

**Essex MJ, Klein MH, Cho E, Kalin NH.** Maternal stress beginning in infancy may sensitize children to later stress exposure: effects on cortisol and behavior. *Biol Psychiatry* 2002;52(8):776-84.

**Fern R.** Intracellular calcium and cell death during ischemia in neonatal rat white matter astrocytes in situ. *J Neurosci* 1998;18(18):7232-43.

**Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B.** Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002;81(6):1285-97.

**Garcia JH, Liu KF, Ho KL.** Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke* 1995;26(4):636-42.

- Gebicke-Haerter PJ, Spleiss O, Ren LQ, Li H, Dichmann S, Norgauer J, Boddeke HW.** Microglial chemokines and chemokine receptors. *Prog Brain Res* 2001;132:525-32.
- Gerhmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg G.** Microglia intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res Rev* 1995; 20: 269-87.
- Giulian D, Ingeman JE.** Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J Neurosci* 1988;8(12):4707-17.
- Gonzalez-Perez O, Ramos-Remus C, Garcia-Estrada J, Luquin S.** Prednisone induces anxiety and glial cerebral changes in rats. *J Rheumatol* 2001;28(11):2529-34.
- Goodman Gilman AS, Goodman L, Gilman A.** Las bases farmacológicas de la terapéutica. ED. Panamericana. 2001; 60: 1649-80.
- Hall RC, Popkin MK, Stickney SK, Gardner ER.** Presentation of the steroid psychoses. *J Nerv Ment Dis.* 1979;167(4):229-36.
- Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM.** Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology* 1990;52(1):57-64.
- Hozumi I, Chiu FC, Norton WT.** Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. *Brain Res* 1990;524(1):64-71.
- Jacobson J, Duchon MR.** Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes--requirement for stored Ca<sup>2+</sup> and sustained opening of the permeability transition pore. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 6):1175-88.
- Juurlink BH.** Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21(2):151-66.
- Kalla R, Bohatschek M, Kloss CU, Krol J, Von Maltzan X, Raivich G.** Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase, and Gi-protein systems. *Glia* 2003;41(1):50-63.
- Kraft SA, Philip Larson C, Shuer LM, Steinberg GK, Benson GV, Pearl RG.** Effect of Hyperglycemia on Neuronal Changes in a Rabbit Model of Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 1990;21(3):447-50.
- Kubli C.** Acción neuromoduladora de las hormonas esteroides. En: *Fundamentos de*

Neuroendocrinologia (Zárate A, Moran C, eds.) México DF 1993, Biblioteca de la salud, pp 93-108.

**Luquin S, Naftolin F, Garcia-Segura LM.** Natural fluctuation and gonadal hormone regulation of astrocyte immunoreactivity in dentate gyrus. *J Neurobiol* 1993;24(7):913-24.

**Markham A, Bryson HM.** Deflazacort. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1995;50(2):317-33.

**Martinelli E, Ferrari P, Ripamonti A, Tuan G, Perazzi A, Assandri A.** Metabolism of deflazacort in the rat, dog and man. *Drug Metab Dispos* 1979;7(5):335-9.

**McEwen BS.** The brain is an important target of adrenal steroid actions. A comparison of synthetic and natural steroids. *Ann N Y Acad Sci* 1997;823:201-13.

**Meijer OC, de Lange EC, Breimer DD, de Boer AG, Workel JO, de Kloet ER.** Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdr1A P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology* 1998;139(4):1789-93.

**Messina OD, Barreira JC, Zanchetta JR, Maldonado-Cocco JA, Bogado CE, Sebastian ON, Flores D, Riopedre AM, Redondo G, Lazaro A.** Effect of low doses of deflazacort vs prednisone on bone mineral content in premenopausal rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992;19(10):1520-6.

**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(1):85-96.

**Moller JC, Klein MA, Haas S, Jones LL, Kreutzberg GW, Raivich G.** Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia* 1996;17(2):121-32.

**Moneta ME, Gehrman J, Topper R, Banati RB, Kreutzberg GW.** Cell adhesion molecule expression in the regenerating rat facial nucleus. *J Neuroimmunol* 1993;45(1-2):203-6.

**Nathansohn G, Pasqualucci CR, Radaelli P, Schiatti P, Selva D, Winters G.** Steroids possessing nitrogen atoms. V. Some pharmacological and chemico-

physical aspects of a new class of active corticoids: [17alpha,16alpha-d]-oxazolino-steroids. *Steroids* 1969;13(3):365-81.

**Omote M, Sakai K, Mizusawa H.** Acute effects of deflazacort and its metabolite 21-desacetyl-deflazacort on allergic reactions. *Arzneimittelforschung* 1994;44(2):149-53.

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

**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(4):949-76.

**Ramos-Remus C, Gonzalez-Castaneda RE, Gonzalez-Perez O, Luquin S, Garcia-Estrada J.** Prednisone induces cognitive dysfunction, neuronal degeneration, and reactive gliosis in rats. *J Investig Med* 2002;50(6):458-64.

**Raber J.** Detrimental effects of chronic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. From obesity to memory deficits. *Mol Neurobiol* 1998;18(1):1-22.

**Reier PJ, Houle JD.** The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. *Adv Neurol* 1988;47:87-138.

**Sapolsky RM.** Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57(10):925-35.

**Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas D, Eder C.** Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K<sup>+</sup> channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur J Neurosci* 2001;14(3):463-73.

**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; 49:188.

**Starkman MN, Giordani B, Berent S, Schork MA, Schteingart DE.** Elevated cortisol levels in Cushing's disease are associated with cognitive decrements. *Psychosom Med* 2001;63(6):985-93.

**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(12):1595-602.

**Stein MB, Koverola C, Hanna C, Torchia MG, McClarty B.** Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse. *Psychol Med* 1997;27(4):951-9.

**Sternberg EM.** Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J Endocrinol* 2001;169(3):429-35.

**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(4):461-83.

**Schiatti P, Selva D, Barone D, Restelli A, Glasser A.** Antiinflammatory activity and other pharmacological properties of 11 beta, 21-dihydroxy-2'-methyl-5' beta H-pregna-1,4 dieno[17,16-d] oxazole 3,20-dione-21-acetate (Deflazacort). *Arzneimittelforschung* 1980;30(9):1543-9.

**Scudeletti M, Pende D, Barabino A, Imbimbo B, Grifoni V, Indiveri F.** Effect of single oral doses of prednisone and deflazacort on human lymphocyte distribution and functions. Analysis with monoclonal antibodies. *Adv Exp Med Biol* 1984;171:335-44.

**Streit WJ, Dumoulin FL, Raivich G, Kreutzberg GW.** Calcitonin gene-related peptide increases in rat facial motoneurons after peripheral nerve transection. *Neurosci Lett* 1989;101(2):143-8.

**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(1):23-37.

**Tanaka J, Toku K, Sakanaka M, Maeda N.** Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. *Neurosci Res* 1999;34(4):207-15.

**Topp KS, Faddis BT, Vijayan VK.** Trauma-induced proliferation of astrocytes in the brains of young and aged rats. *Glia* 1989;2(3):201-11.

**Travis CC, Bowers JC** Interspecies scaling of anesthetic potency. *Toxicol Ind Health.* 1991;7(4):249-60.

**Unsicker K, Kriegelstein K.** TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival. *Adv Exp Med Biol* 2002;513:353-74.

**Weibel ER.** Stereological methods-1. In: Weibel ER, editor. *Practical methods for*

biological morphometry. 1979; London: Academic Press.

**Wilckens T, De Rijk R.** Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol Today* 1997;18(9):418-24.

**Wolkowitz OM.** Prospective controlled studies of the behavioral and biological effects of exogenous corticosteroids. *Psychoneuroendocrinology*. 1994;19(3):233-55.

**Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J.** A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(23):13496-500.

## **Anexo**

---

### **Conferencias:**

XIX Encuentro Nacional y XIV Latinoamericano de estudiantes de Psicología Facultad de Psicología U de G. Guadalajara México (Sep. 2-4 del 2004).

### **Congresos:**

XIII Congreso de la Sociedad de Cirugía Neurológica de Occidente, A.C. III Reunión Internacional de Cirugía Cerebrovascular Sociedad Mexicana de Cirugía Neurológica A.C. "Congreso Internacional Multidisciplinario" (Jul 26-31 del 2004).

XLVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas "La Administración Crónica de Deflazacort vs. Prednisona en la Inducción de daño neuronal y glial en el cerebro de rata (Ago 1-5 del 2004).

Coloquio Conmemorativo del X Aniversario del Instituto de Neurociencias "La administración crónica de Deflazacort vs. Prednisona en la inducción de daño neuronal reactividad glial en ratas" (Sep-Oct 29-1del 2004).

III Congreso Nacional de Neuropsicología. Dentro del Marco de la XXVII Asamblea Médica de Occidente "Deflazacort vs Prednisona en la inducción de daño neuronal y reactividad glial en el cerebro de la rata" (Oct 20-23 del 2004).

34 th. Congreso Anual de la Sociedad de Neurociencias. Centro de Convenciones, en San Diego, California E.U. " Prednisone vs. Deflazacort, neuronal degeneration and reactive gliosis in rat" (Oct 23-27 del 2004).

XV Semana Nacional de la Investigación Científica. CUCS U de G. " Prednisone vs. Deflazacort, neuronal degeneration and reactive gliosis in rat " (Nov-22-26 del 2004).