



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

**PAPEL DE LAS HORMONAS ESTEROIDES  
SEXUALES EN LAS CRISIS DE AUSENCIA EN  
RATAS MUTANTES DE MIELINA *TAIEP***

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

ESTEFANÍA GRADOS PORRO

**DIRECTORA DE TESIS:**

DRA. MA. DEL CARMEN CORTÉS SÁNCHEZ

**CODIRECTOR DE TESIS:**

DR. JOSÉ RAMÓN EGUIBAR CUENCA

## **Agradecimientos**

Agradezco a los proyectos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de Ciencia Básica con números 24333 y 243247 a favor de Ma. del Carmen Cortés Sánchez y José Ramón Eguibar Cuenca, respectivamente.

Al apoyo recibido por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Subsecretaría de Educación Superior – Secretaría de Educación pública para el cuerpo académico en Neuroendocrinología, BUAP-CA-288.

Agradezco al jurado del examen: al Sr. Vicerrector, el Dr. Ygnacio Martínez Laguna, y a la Dra. María Lilia Cedillo Ramírez, por las observaciones y contribuciones realizadas a esta tesis.

Al Dr. José Ramón Eguibar y a la Dra. Carmen Cortés, por permitirme realizar mi tesis en el Laboratorio de Neurofisiología de Conducta y Control Motor, por su confianza, sus consejos y su enorme ayuda en mi formación como investigadora.

Agradezco a mi familia Grados y mi familia Porro por su apoyo y motivación desde el principio. A mis padres: Héctor Hernán Grados Jiménez por su interés y apoyo, a María Martha Porro Torres porque sin ella nada de esto hubiera sido posible.

A mis amigas: Dana y Marilú, Mabel, Pili y Xime por sus consejos y compañía constante. A mis amigos: todos los de medicina, por hacerme sentir como uno de ustedes, especialmente a Rich por su paciencia y compañía en mis noches de registro; a los franceses Hugues y Mathis por sacrificar tiempo de sus vacaciones en México por mí.

A todos mis compañeros de biotecnología, especialmente a Richi, Alexis, Montse, Fabri, Kenneth y Dany, por su amistad durante estos años de carrera.

Gracias a todos los integrantes del Laboratorio de Neurofisiología de Conducta y Control Motor: a la M.C. Aracely Ugarte por su apoyo en los procesos experimentales, al M.C. Juan Manuel Ibarra, por su paciencia, ayuda y compañía desde que llegué al laboratorio, al M.V.Z Omar Isidro por el cuidado y mantenimiento de los animales de laboratorio. A mis compañeros: Adriela, Ángeles Dorantes, Ángeles Carrasco, Lili, Carlos, Nagib, Alfonso, Karely, Adriana, Jesús, Salvador, Juan Carlos, y Ana, por su amistad y apoyo.

## Lista de abreviaturas

AP	Antero-posterior
Cx	Corteza cerebral
DEO	Descarga espiga-onda
DV	Dorso-ventral
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
EOG	Electrooculograma
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor GABA tipo A
GABA <sub>B</sub>	Receptor GABA tipo B
GABA <sub>C</sub>	Receptor GABA tipo C
GAERS	Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg
Hp	Hipocampo
i.p	Intraperitoneal
ILAE	De las siglas en inglés International League Against Epilepsy
ML	Medio-lateral
Pg	Progesterona
PTZ	Pentilenetetrazol
s.c	Subcutánea
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
WAG/Rij	De las siglas en inglés Wistar Albino Glaxo/Rijswijk rats

## 1. Resumen

La epilepsia del tipo crisis de ausencia es un trastorno cerebral caracterizado por la presencia de crisis no convulsivas en las que ocurre una pérdida de la consciencia abrupta y repentina que se acompaña de descargas tipo espiga-onda en ambos hemisferios cerebrales cuando se registra mediante electroencefalografía (EEG). En México, existen alrededor de 2 millones de personas con epilepsia, de los cuales alrededor de 63 mil corresponden al tipo de las crisis de ausencia (Posner, 2008). Un modelo de estudio para las crisis de ausencia es el mutante de mielina *taiep* que proviene de una mutación autosómica recesiva espontánea que se obtuvo a través de cruces endogámicos. La presencia de las crisis de ausencia en la rata *taiep* es sexualmente dimórfica, en los machos se presenta a partir de los tres meses y en las hembras hasta los seis meses, por lo que se infiere que las hormonas sexuales son moduladoras de esta epilepsia y afectan la susceptibilidad a presentar las crisis. Se ha reportado en ratas macho que la testosterona puede disminuir la frecuencia de crisis de ausencia en las primeras dos horas posteriores a su administración. El objetivo del presente trabajo es el de evaluar, mediante registros encefalográficos, el efecto que tienen los andrógenos testiculares como moduladores en las crisis de ausencia en las ratas *taiep* macho; así como el efecto de la progesterona, la testosterona y el  $17\beta$ -estradiol al ser administrados vía subcutánea en dosis de 1mg/Kg.

Se emplearon ratas macho de tres meses de edad a las cuales mediante cirugía estereotáxica se les implantaron electrodos en el hipocampo, en dos cortezas cerebrales, en los músculos de la nuca y en la órbita ocular para registrar los movimientos oculares. Los sujetos se dividieron en tres grupos: control sin orquiectomía, con orquiectomía adulta y con orquiectomía neonatal y a las cuales se les administraron tres hormonas esteroides: la progesterona, la testosterona y el  $17\beta$ -estradiol. Posteriormente se realizaron registros encefalográficos de 24h de duración acoplados a videograbación y se evaluó la frecuencia y la duración de cada crisis. Se consideró una diferencia significativa cuando la probabilidad fue de 0.05 o menos.

La orquiectomía en ratas macho *taiep* adultas aumentó de manera significativa en frecuencia y duración de las crisis de ausencia, mientras la orquiectomía neonatal disminuyó significativamente estas crisis. Por otro lado, la administración aguda de progesterona y de testosterona en ratas control o con orquiectomía no tuvo ningún efecto sobre la frecuencia, duración o latencia de las crisis de ausencia. Sin embargo, el 17 $\beta$ -estradiol disminuyó la duración de las crisis de ausencia significativamente en las ratas con orquiectomía adulta.

En conclusión, la orquiectomía neonatal altera los mecanismos organizacionales del cerebro de la rata, disminuyendo las crisis de ausencia; mientras la orquiectomía adulta aumenta la frecuencia las crisis probablemente al impactar el circuito tálamo-cortical que genera y mantiene este tipo de epilepsia. En cuanto a la administración de progesterona, 17 $\beta$ -estradiol y testosterona, solamente la administración de 17 $\beta$ -estradiol en ratas con orquiectomía adulta disminuyó la duración de las crisis. Nuestros resultados muestran el efecto dual de la orquiectomía en un modelo animal de crisis de ausencia como lo es la rata *taiep*.

# ÍNDICE

1. Resumen .....	4
1. Introducción.....	8
1.1. Definición y clasificación de epilepsia y de las crisis. ....	8
1.2. Crisis de ausencia .....	10
1.3. Fisiopatología de las crisis de ausencia .....	11
1.4. Hormonas.....	13
1.4.1. Hormonas sexuales.....	14
1.4.1.1. Rol de la Progesterona .....	18
1.4.1.2. Rol de la testosterona .....	20
1.4.1.3. Rol del 17 $\beta$ -Estradiol .....	21
1.4.1.4. Diferenciación sexual .....	22
1.5. El sistema GABAérgico.....	25
1.6. Modelos animales de crisis de ausencia .....	27
1.6.1. La rata Genetic Absence Epilepsy from Strasbourg (GAERS) .....	29
1.6.2. Las ratas Wistar Albino Glaxo de Rijswijk (WAG/Rij) .....	31
1.6.3. La rata <i>taiep</i> .....	32
2. Justificación.....	36
3. Hipótesis .....	36
4. Objetivos.....	36
5. Metodología.....	37
5.1. Sujetos.....	37
5.2. Implantes estereotáxicos.....	39
5.3. Habitación .....	41
5.4. Orquiectomía .....	41
4.4.1 Adultos .....	41
4.4.2 Neonatales .....	42
5.5. Registro .....	42
5.6. Análisis estadístico .....	43
6. Resultados .....	44
6.1. Frecuencia, duración y latencia de las crisis de ausencia con orquiectomía neonatal y adulta	

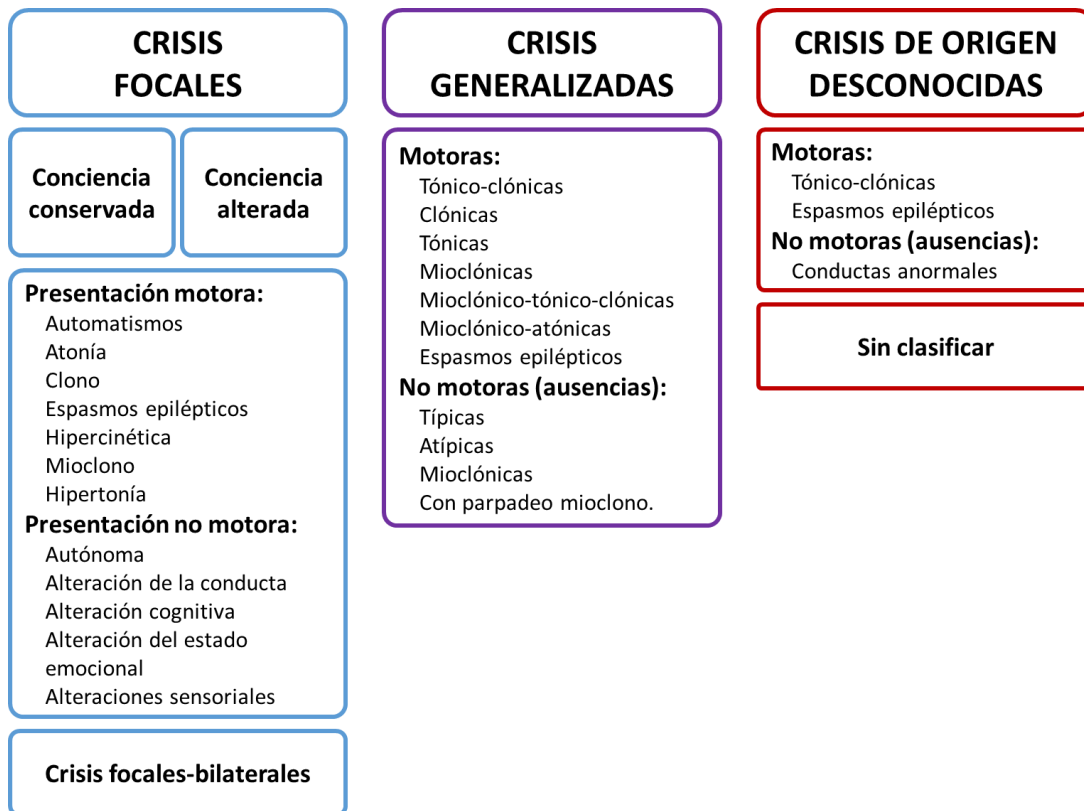
6.1.1.	Efecto de la administración del 17 $\beta$ -estradiol en las crisis de ausencia en ratas <i>taiep</i> con orquiectomía.....	46
6.1.2.	Efecto de la administración de la progesterona en las crisis de ausencia en ratas <i>taiep</i> con orquiectomía .....	47
6.1.3.	Efecto de la administración de la testosterona en las crisis de ausencia en ratas <i>taiep</i> con orquiectomía .....	¡Error! Marcador no definido.
	.....	¡Error! Marcador no definido.
6.2.	Grupo sin orquiectomía .....	51
6.2.1.	Efecto de la administración del 17 $\beta$ -estradiol en las crisis de ausencia en ratas <i>taiep</i> sin orquiectomía.....	51
6.2.2.	Efecto de la administración de la progesterona en ratas <i>taiep</i> sin orquiectomía en las crisis de ausencia .....	52
	.....	¡Error! Marcador no definido.
6.2.3.	Efecto de la administración de la testosterona en ratas <i>taiep</i> sin orquiectomía en las crisis de ausencia .....	54
7.	Discusión de Resultados.....	56
7.1.	Rol de los andrógenos gonadales. Efectos de la orquiectomía adulta y neonatal .....	56
7.2.	Administración de progesterona .....	58
7.3.	Administración del 17 $\beta$ -estradiol.....	59
7.4.	Administración de testosterona .....	60
8.	Conclusiones .....	62
	Bibliografía .....	63



# 1. Introducción

## 1.1. Definición y clasificación de epilepsia y de las crisis.

La epilepsia es un trastorno que interfiere con la conducta, percepción, movimiento y consciencia, entre otras funciones cerebrales, y origina una predisposición a sufrir crisis epilépticas no provocadas (Fisher y cols., 2005). Las crisis epilépticas se definen como una ocurrencia transitoria de ciertos signos o síntomas dadas por una actividad neuronal excesiva en el cerebro. Cuando el problema es persistente recibe el nombre de epilepsia (Bennett y Krein, 1989).



**Figura 1. Clasificación de las crisis propuesta por la liga internacional contra la epilepsia (ILAE) del 2017.** Las crisis se clasifican en generalizadas, focales o de origen desconocido. Las crisis focales se pueden clasificar de acuerdo al estado de consciencia y posteriormente se clasifican en motoras y no motoras. Las crisis generalizadas se clasifican en crisis motoras o no motoras, también nombradas ausencia. La clasificación de origen desconocida se da cuando no se tiene una evidencia suficiente para caracterizarlas en crisis focales o generalizadas. Modificado de Fisher y cols., 2017.

En 1969, la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, de sus siglas en inglés International League Against Epilepsy) publicó un esquema para la clasificación de los tipos de epilepsia. Desde entonces, se han desarrollado diferentes metodologías incluyendo grabaciones electroencefalográficas para obtener una clasificación más precisa de estas crisis (Figura 1; Penry, 1981).

Más detalladamente las crisis se clasifican en:

- ❖ Crisis focales: Antes llamadas parciales. Son crisis originadas en algún momento dentro de redes neuronales y se limitan a un hemisferio del cerebro, dividiéndose en: originadas en el lóbulo frontal, originadas en el lóbulo parietal, originadas en el lóbulo temporal y originadas en el lóbulo occipital. Estas crisis pueden estar localizadas en un punto o estar distribuidas de manera más amplia y generalmente se originan en estructuras subcorticales. El siguiente nivel de clasificación de estas crisis depende del estado de consciencia, que se define como el conocimiento de uno mismo y del ambiente que le rodea y este a su vez, se divide en:
  - Conciencia conservada: La consciencia se mantiene intacta. El individuo mantiene un estado de alerta.
  - Conciencia alterada: El individuo pierde el estado de alerta, junto con el pleno conocimiento de sí mismo y de su entorno.
- ❖ Crisis generalizadas: Se originan en algún momento dentro de redes neuronales distribuidas bilateralmente en el cerebro. Estas se dividen en dos tipos principales:
  - Motoras: Involucran aumento o disminución de la contracción muscular que produce movimiento.
  - No motoras: No interfieren con la contracción muscular.
- ❖ Crisis de origen desconocido: No se pueden clasificar, ya que no se posee información o evidencia suficiente para clasificarlas en generalizadas o focales. Estas pueden darse como:
  - Espasmos epilépticos: Requieren de un monitoreo a través de un video acompañado de un electroencefalograma para poder clasificarlo.

- De comportamiento alterado: Puede representar una crisis focal con conciencia alterada y un comportamiento anormal.

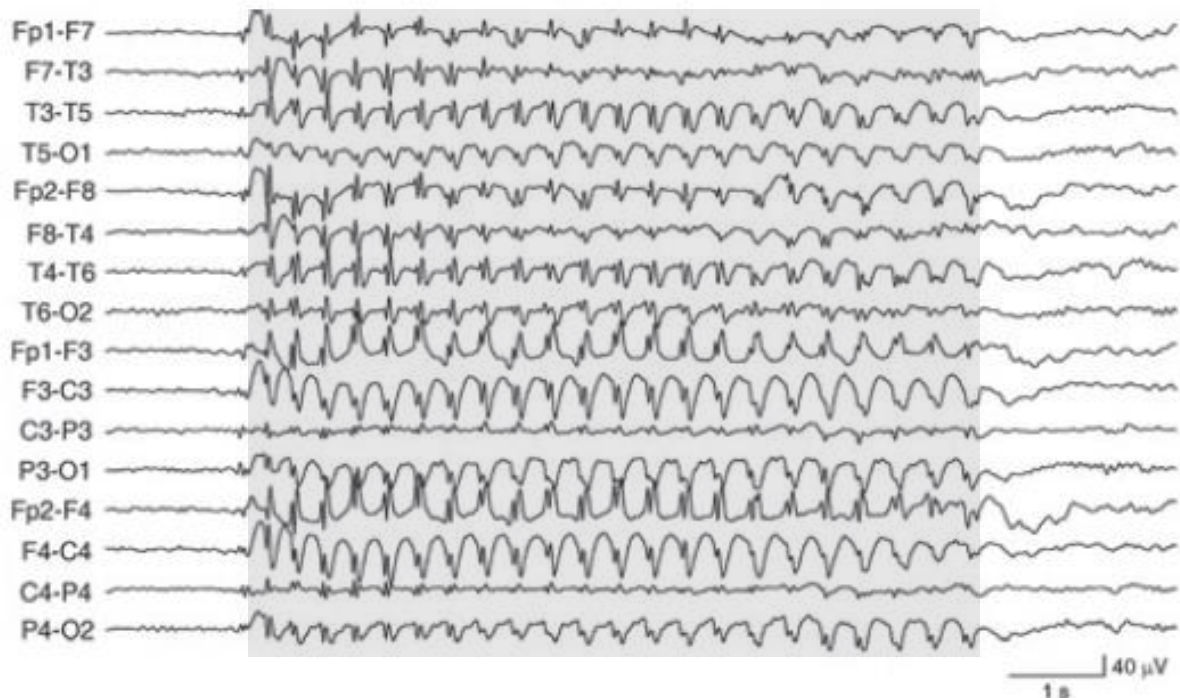
(Abou-khalil y cols., 2016; Fisher y cols., 2017).

Existe una clasificación más amplia de las crisis de ausencia en donde se expanden las categorías de “motora” y “no motora”, bajo los tres tipos principales de crisis (generalizada, focal y de origen desconocidas), dividiéndose en tres niveles: En el primer nivel se clasifica de acuerdo al tipo de crisis, posteriormente de acuerdo al tipo de epilepsia, y en el último nivel de acuerdo a los signos y síntomas que se presentan (Falco-Walter, Scheffer, y Fisher, 2018).

## 1.2. Crisis de ausencia

Las crisis de ausencia son episodios frecuentes y cortos de inconciencia, los cuales pueden estar acompañados de movimientos involuntarios. Estos tipos de crisis son más frecuentes en niños o en adolescentes, y representan el 10% de todas las epilepsias generalizadas y un tercio de ellas tienen como factor causal el genético (Posner, 2008). Las crisis de ausencia tienden a ser más repentinas y presentar automatismos menos complejos que otros tipos de crisis generalizadas (Fisher y cols., 2017).

Existen muchas clasificaciones para las crisis de ausencia. Una de las más utilizadas para describirlas es la electroencefalográfica que se basa en el registro de la actividad eléctrica en la superficie del cráneo como fue descrito por primera vez por Hans Berger en 1933 (Penry, 1981; Avoli, 2012). Las crisis de ausencia se pueden observar en el electroencefalograma en humanos como descargas tipo espiga-onda (DEO) con una frecuencia 2.5 a 4 Hz en ambos hemisferios del cerebro, es decir, son bilaterales y sincrónicas (Avoli, 2012). El inicio y término son repentinos, con un registro electroencefalográfico sin depresión de voltaje post-ictal y con una duración mayor a un segundo (véase Figura 2).



**Figura 2. Registro encefalográfico de una descarga espiga-onda en un paciente de 10 años.** Note la forma de la descarga tipo espiga-onda generalizada en todos los canales, su sincronización entre ambos hemisferios del cerebro, la duración mayor a un segundo y una terminación abrupta seguida de un retorno al patrón de electroencefalograma que ya se tenía antes de la crisis. Se marca con gris la forma de espiga-onda en los diferentes canales. El margen derecho corresponde a la derivación del EEG con el sistema 10/20. Modificado de Avoli, 2012.

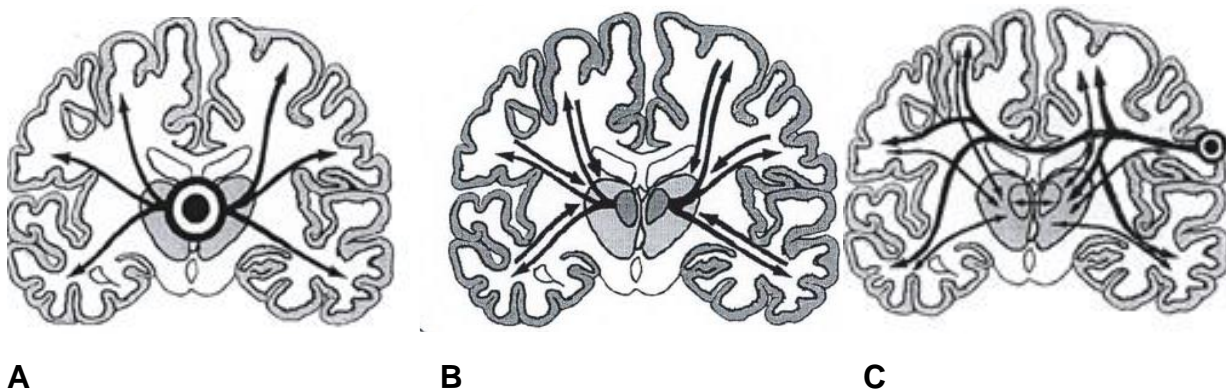
En México existen cerca de 2 millones de personas con epilepsia, de los cuales alrededor de 63 mil corresponden a crisis de ausencia (Posner, 2008; Secretaría de Salud, 2016).

### 1.3. Fisiopatología de las crisis de ausencia

El concepto de epilepsia y crisis de ausencia se remonta al año 1705, cuando Poupart, y posteriormente Tissot, describieron la enfermedad denominándola *le petit mal* o “pequeño mal”, para diferenciar a este tipo de crisis del “gran mal” que corresponde a las crisis tónico-clónicas. La historia moderna de las descargas espiga-onda comenzó con Hans Berger en 1933, quien logra realizar los primeros estudios electroencefalográficos

en un paciente durante una crisis de ausencia. Berger creía que las crisis eran provocadas por un retiro de las influencias inhibitorias ejercidas por el tálamo, lo que se convirtió en una de las principales hipótesis sobre esta patología cerebral (Avoli, 2012).

En 1941, Jasper y Kershman analizando registros electroencefalográficos de pacientes con crisis de ausencia propusieron que su origen se daba en estructuras subcorticales. Esto dio paso a estudios ulteriores donde se establecieron los primeros modelos experimentales animales estimulando a baja frecuencia los núcleos talámicos en gatos y produciendo DEO sincrónicas y bilaterales (Meeren y cols., 2005). Sin embargo, no fue hasta que Penfield y Jasper en 1957 observaron que la estimulación eléctrica en la corteza no provocaba DEO, lo que reforzó la hipótesis “centroencefálica” (Meeren y cols., 2005).



**Figura 3. Tres hipótesis sobre el origen de las crisis de ausencia. A) Hipótesis centroencefálica.** Propone un origen subcortical de las descargas en ambos hemisferios. **B) Hipótesis corticorreticular.** Las DEO se originan en la sustancia reticular del tallo cerebral. **C) Hipótesis cortical focal.** Propone que el origen de las descargas se da en ciertas neuronas piramidales donde se propagan hacia otras regiones de la corteza cerebral a través de la red tálamo-cortical. Modificado de Meeren y cols., 2005.

Las investigaciones de Gibbs y Gloor, en 1953 muestran la inducción del patrón espiga-onda al administrar fármacos convulsivos en la arteria carótida, lo cual suministra el fármaco a la corteza y da lugar a la hipótesis corticorreticular de Gloor (Figura 3; Meeren y cols., 2005). Dejando claro que el tálamo no actúa como una fuente primaria para iniciar las descargas, pero sí que las neuronas del núcleo reticular talámico comandan el ritmo de estas descargas, y que son las conexiones intracorticales y callosas fundamentales para la propagación y generalización de las DEO (Meeren y cols., 2005).

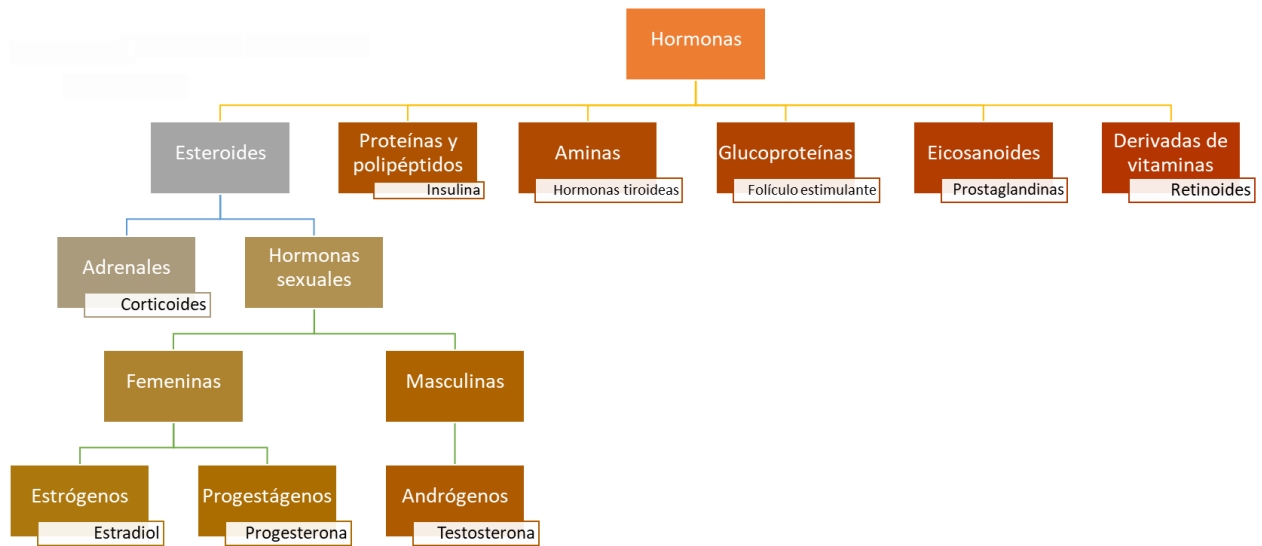
Para elucidar el mecanismo neuronal que genera las descargas espiga-onda, Meeren y colaboradores realizaron estudios en las ratas Wistar Albino Glaxo from Rijswijk (WAG/Rij) con crisis de ausencia inactivando el tálamo y la corteza, demostrando que el tálamo, y el núcleo reticular talámico, es necesario para que se generen las descargas, y que es el circuito intratalámico por sí solo no suficiente para generar las oscilaciones de tipo descarga espiga-onda (Meeren y cols., 2005).

Sin embargo, estudios recientes afirman que las DEO en las ratas WAG/Rij y en las Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) inician en la corteza somatosensorial en las neuronas piramidales y que estas se propagan hacia el tálamo. Por lo que la hipótesis actual es que las DEO se generan en la corteza cerebral y se mantienen por el tálamo (Jarre y cols., 2017).

#### 1.4. Hormonas

La palabra hormona proviene del griego “ormao” que significa mover (Dorantes-Cuéllar y cols., 2016). La primera definición de hormona fue dada por el profesor Ernes Starling en 1905, que la definió como: “mensajeros químicos, los cuales tienen que ser llevados del órgano donde se realiza su producción al órgano sobre el que ellos actúan por medio del torrente sanguíneo” (Dorantes-Álvarez y cols., 2005).

Hoy en día las hormonas se definen como “aquella sustancia secretada en un limitado número de tejidos y que es capaz de actuar como mediador químico tejidos blanco o diana”. Según su clasificación química las hormonas se dividen en: (1) esteroides; (2) proteínas y péptidos; (3) derivados de aminas; (4) glucoproteínas; (5) eicosanoides; y (6) derivados de vitaminas (véase Figura 4; Jameson y Harrison, 2013)

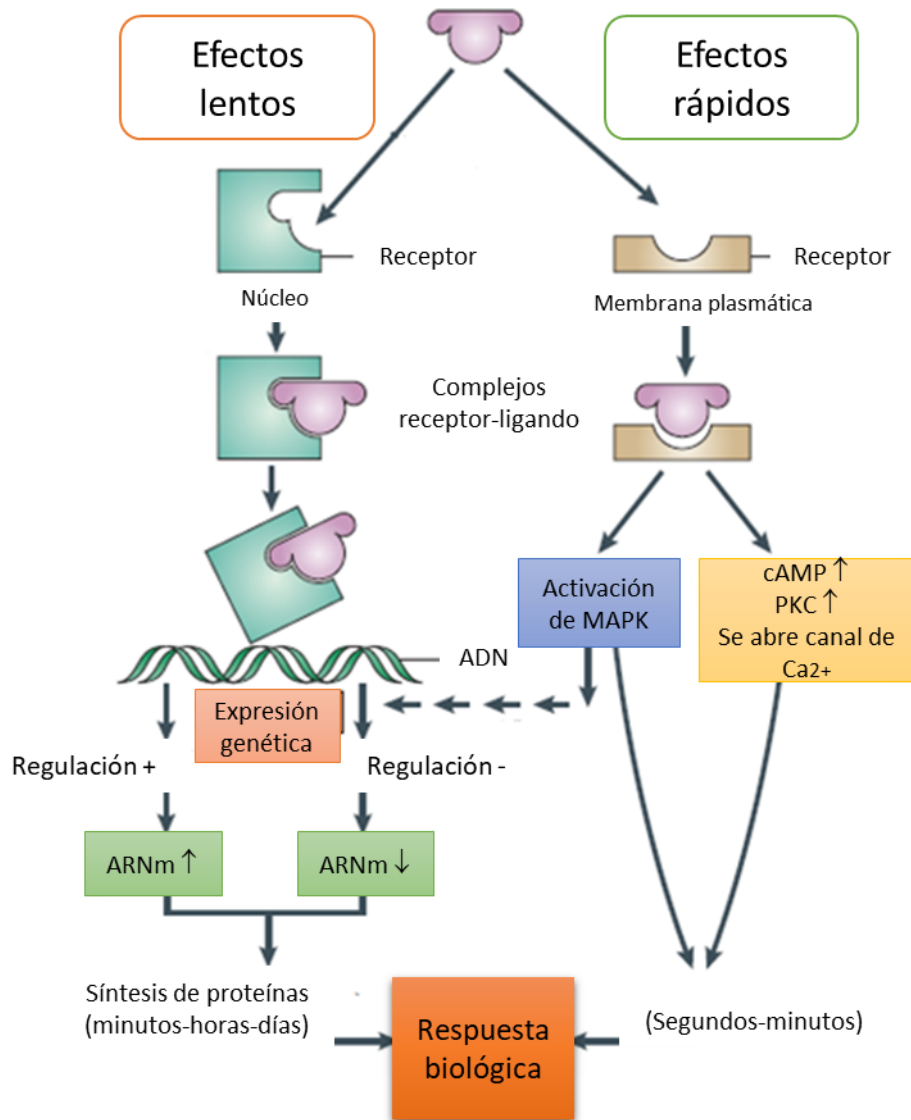


**Figura 4. Clasificación y ejemplos de los diferentes tipos de hormonas.** La clasificación de las hormonas está dada por su composición química, dividiéndose en seis grupos: esteroides, proteínas y polipéptidos, aminas, glucoproteínas, eicosanoides y derivadas de vitaminas. Dentro de las hormonas esteroides se encuentra una subdivisión en base a por el lugar donde se secretan. Por último, las hormonas sexuales se subdividen en hormonas masculinas o femeninas. Debajo de cada tipo de hormona se observa un ejemplo de esta división. Modificado de Jameson y Harrison, 2013.

#### 1.4.1. Hormonas sexuales

Los estrógenos, andrógenos y la progesterona pertenecen a la clasificación química de las hormonas esteroides. Son llamadas hormonas sexuales ya que influyen en el desarrollo de los órganos sexuales, se producen de manera natural en los ovarios y en los testículos de los vertebrados y son responsables de la ovulación (estrógenos), del mantenimiento del embarazo (progesterona) y de la espermatogénesis (andrógenos; Greenspan y Gardner, 2012; Jameson y Harrison, 2013).

La liberación de estas hormonas está controlada por el eje hipotálamo-pituitario-gonadal. Las principales hormonas sexuales son la testosterona, los estrógenos y la progesterona (Pennell, 2009). Los receptores para estas hormonas pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares y son encargados principalmente de regular transcripcionalmente a ciertos genes (Ogino y cols., 2016).



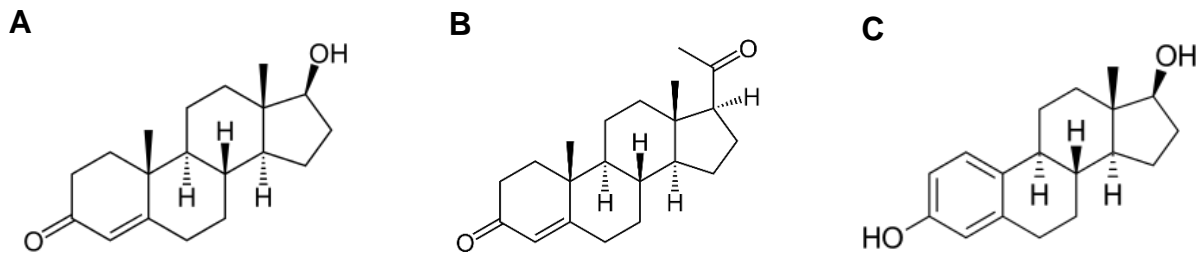
**Figura 5. Efectos genómicos (lentos) y no genómicos (rápidos) de las hormonas esteroides.** En la vía genómica, la hormona esteroide sexual se une al receptor que se encuentra en el núcleo de la célula, esta respuesta puede aumentar o disminuir la expresión de genes. En la vía no genómica la hormona se une al receptor que se encuentra en la membrana plasmática de la célula, lo que genera una respuesta rápida por medio de segundos mensajeros, ya sea a través de la respuesta biológica o modulando la respuesta genómica. cAMP= Adenosin monofosfato cíclico; MAPK= cinasas activadas por nitrógeno; ARNm= ARN mensajero; PKC= Protein cinasa. Modificado de Norman, y cols., 2004.

Se sabe que estas hormonas tienen efectos tanto en la estructura como en la función celular produciendo efectos genómicos (lentos) y no genómicos (rápidos) (véase Figura



5; McEwen, 1991). Además, las hormonas esteroides sexuales son capaces de producir diferentes efectos en el desarrollo del sistema nervioso (Melcangi y cols., 2006).

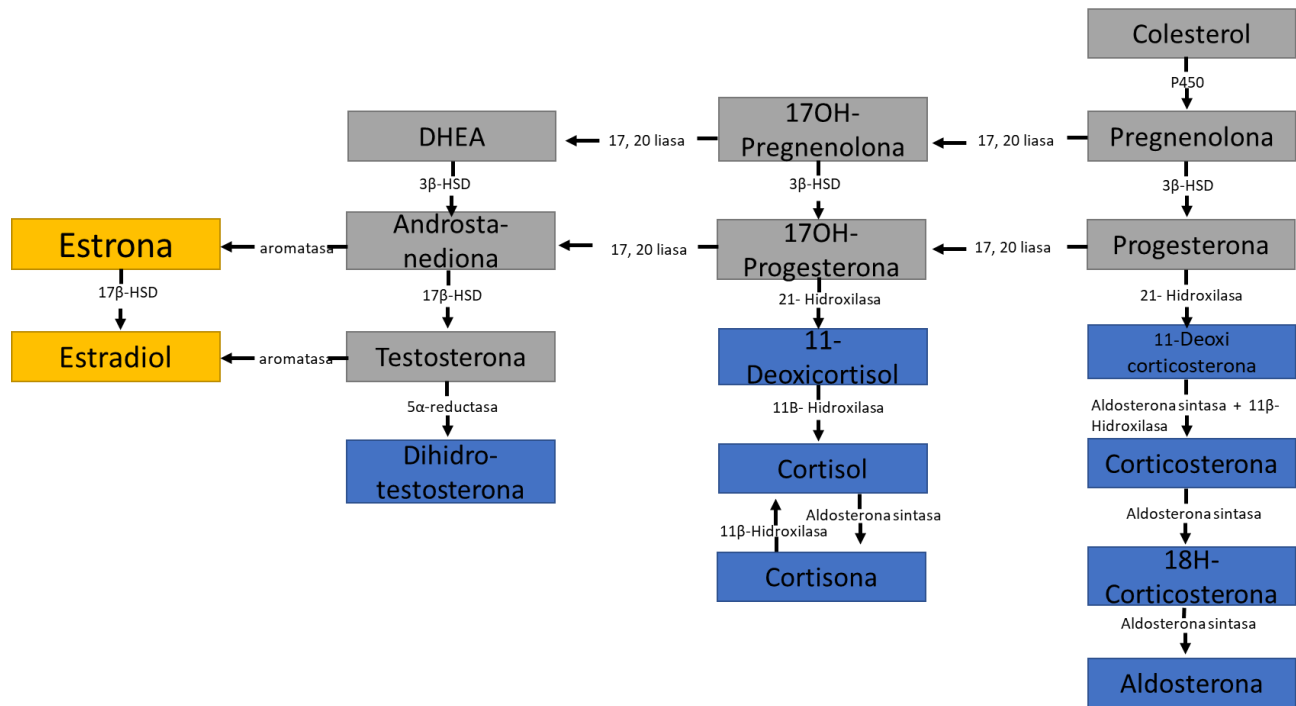
Otros de los principales efectos de las hormonas esteroides es la diferenciación sexual que ocurre en el cerebro y su acción está mediada por receptores cerebrales. La diferenciación sexual en mamíferos se da al final del embarazo y da lugar a cambios permanentes en diferentes estructuras y funciones cerebrales (Swaab, 2007). Las diferencias sexuales en las estructuras cerebrales son permanentes y están involucrados con funciones que van más allá de la conducta sexual, como son las funciones cognitivas (Horn y Buterbaugh, 1986).



**Figura 6. Estructura de los esteroides sexuales empleados. A) Testosterona.** Hormona perteneciente al grupo de los andrógenos. **B) Progesterona o pregn-4-en-3,20-diona.** Perteneciente al grupo de los progestágenos. **C) 17β-estradiol.** Perteneciente al grupo de los estrógenos, es producida como metabolito de la testosterona por acción de la enzima aromatasa.

La relación entre el sistema GABAérgico y las hormonas sexuales fue estudiada por Saad en 1970, al demostrar que la ovariectomía aumentaba el contenido del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en los hemisferios cerebrales (Maggi y Perez, 1984). Además, se ha estudiado la habilidad de las hormonas esteroides sexuales para modular la excitabilidad del cerebro, influyendo en su desarrollo temprano y modulando su actividad durante toda la vida. Sus efectos pueden ser a través de receptores específicos dentro de la célula o en los receptores que tienen ciertos neurotransmisores (McEwen, 1991). También existe un efecto nuclear que requiere la dimerización y la producción de proteínas dependientes de la acción, por ejemplo, los estrógenos inducen la síntesis de receptores a progesterona (Leavitt y cols., 1977). Los esteroides también ejercen efectos

de membrana activando cascadas intracelulares que modifican a las proteíncinas como son la A, la C o la extracelular, activando la fosforilación y la vía de las cinasas activadas por nitrógeno (MAPK, por sus siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases) (Watters y cols., 1997).



**Figura 7. Síntesis de las hormonas esteroides sexuales.** Se marcan con gris los primeros pasos en la esteroidogénesis llevada a cabo en células de Leydig en los testículos, y en las células de la teca en los ovarios. En amarillo se marcan los procesos de conversión de los andrógenos a estrógenos por medio de la enzima aromatasa. Por último, con azul se marcan los pasos que se llevan a cabo en otros tejidos, como son piel, próstata y epidídimo. 17β-HSD = Enzima beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa, perteneciente al grupo de las enzimas alcohol oxidoreductasas. 5α-reductasa= 3-oxo-5-alfa-esteroide 4-deshidrogenasa, enzima esencial en el metabolismo de andrógenos y estrógenos. 3β-HSD=3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, cataliza la conversión oxidativa de los hidroxiesteroides. Modificado de Alexandra Rotstein, 2011

Estudios revelan que tanto los estrógenos como la progesterona pueden regular a los receptores para el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), principalmente para los receptores de tipo GABA<sub>A</sub>. Indicando que estas hormonas juegan un papel importante en la transmisión GABAérgica en el sistema nervioso central (SNC; Maggi y cols., 1984).

Por otro lado, se sabe que la organización sináptica en el núcleo ventromedial hipotalámico varía entre machos y hembras y que los estrógenos afectan la anatomía y la fisiología del hipocampo en los roedores (Horn y Buterbaugh 1986). Además, se sugiere que existe una interacción importante entre las hormonas del eje hipotálamo-pituitario-adrenal en el control de las crisis epilépticas (Horn y Buterbaugh 1986).

La progesterona, el estradiol y la testosterona ejercen efectos opuestos en los modelos genéticos de crisis de ausencia y en los modelos inducidos mediante fármacos (van Luijtelaar y cols., 2014). Por lo tanto, el efecto que tienen estas hormonas depende de la edad, el género, el modelo y las dosis utilizadas en el estudio. Por lo que, en la literatura es contradictorio cual es el rol de estas hormonas sobre las crisis epilépticas.

La mayoría de los estudios de crisis de ausencia en animales no muestran diferencias entre sexos, principalmente debido a que la mayoría de las investigaciones se enfocan a estas diferencias (van Luijtelaar y cols., 2001). De hecho, muchos investigadores se centran en el estudio en un solo género para el estudio de crisis de ausencia (van Luijtelaar y cols., 2014). Una tendencia que se da en casi todos los estudios conductuales fisiológicos y farmacológicos incluso en ensayos clínicos (Cortés y Fierro, 2018). Este sesgo ha llevado a la inclusión de mujeres en ensayos clínicos mediante la ley de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) titulada “Las mujeres y las minorías como sujetos en la investigación clínica”, la cual se consolidó en el año 2000 (Cortés y Fierro, 2018). Después de constatar que la diferente respuesta dependiente del sexo puede observarse en la prevalencia, el diagnóstico, la severidad y el resultado del estado de la enfermedad o del tratamiento de las personas (Liu y Dipietro Mager, 2016).

#### 1.4.1.1. Rol de la Progesterona

La progesterona es la principal hormona femenina encargada del sostenimiento del embarazo. Juega un papel importante en el desarrollo y diferenciación del útero y de las

glándulas mamarias. Sus efectos son mediados principalmente a través de receptores nucleares. Esta hormona es secretada en pequeñas cantidades durante toda la vida de la mujer. Se absorbe de manera rápida y tiene una vida media de 5 minutos (Jameson y cols., 2010; King y Brucker, 2011).

En estudios con humanos, utilizando una dosis de 50 mg de progesterona al día por vía intramuscular, se observó un aumento en las crisis de ausencia (Grünewald y cols., 1992), también se ha demostrado que al administrar dosis agudas de estrógenos aumentaba la actividad epiléptica mediada por pentilenetetrazol en el electroencefalograma (Buterbaugh, 1989).

Existen resultados que indican que las concentraciones endógenas de progesterona tienen una fuerte influencia en el número de DEO (Van Luijtelaar y cols., 2001), ya que la progesterona tiene efectos inhibitorios en la excitabilidad neuronal y por lo tanto, en las crisis epilépticas (Herzog y Fowler, 2005). De hecho, la progesterona y sus metabolitos tales como pregnenolona y pregnanediol activan al receptor GABA<sub>A</sub>, incrementando el tiempo que permanece abierto el canal de Cl<sup>-</sup> y aumentando la inhibición (McEwen y cols., 1987).

En ratas WAG/Rij hembra, cuando se administra la progesterona o al evaluar las DEO a través del ciclo estral, se ha observado un aumento de las crisis de ausencia cuando los niveles de progesterona son mayores a los basales (van Luijtelaar y cols., 2001, 2014). Así como un incremento en la frecuencia y duración de las crisis de ausencia posterior a la ovariectomía, la cual reduce los niveles de progesterona y estradiol (Yildiz y cols., 2011).

Los estudios de van Luijtelaar y sus colaboradores, en los cuales administraron 20 mg/Kg de progesterona de forma aguda, observan un aumento de las crisis de ausencia durante la primera hora después de la inyección y una disminución en las horas subsiguientes. Estos autores lo atribuyeron a la progesterona o su metabolito, alopregnanolona, el cual es un modulador positivo de la subunidad  $\delta$  del receptor extrasináptico del receptor GABA<sub>A</sub> (Van Luijtelaar y cols., 2001).

#### 1.4.1.2. Rol de la testosterona

La testosterona es el principal andrógeno producido por los testículos de los machos. Más de 95% de la testosterona es secretada a través de las células Leydig en los testículos y su liberación está controlada por el eje hipotálamo—hipófisis-células de Leydig (Greenspan y Gardner, 2012).

Comúnmente se piensa que la testosterona es la hormona “masculina”, ya que es la principal hormona producida por los testículos, sin embargo, la testosterona también es esencial en las hembras ya que es el precursor de estradiol a través de su biotransformación por la enzima aromatasa. La testosterona en hembras es sintetizada en las células tecales del ovario y convertidas a estradiol en las células de la granulosa en el folículo primario, de ahí el estradiol es secretado al torrente sanguíneo hacia los tejidos diana (véase Figura 7; Scharfman y MacLusky, 2006).

Existe evidencia clínica que sugiere que las hormonas sexuales masculinas, principalmente la testosterona, afectan la ocurrencia de DEO en hombres (Reddy, 2004). La incidencia de epilepsia en hombres es aproximadamente 15% mayor y muchos de los hombres que presentan esta enfermedad muestran una deficiencia de testosterona (Macphee y cols., 1988; Reddy, 2004). Sin embargo, en modelos animales en los que se utilizan diferentes tipos de epilepsia o de inductores de la epilepsia, esto varía considerablemente (Herzog y Fowler, 2005).

En cuanto a los efectos de la testosterona en las crisis inducidas mediante fármacos, se ha demostrado que la testosterona en una dosis de 2mg/Kg reduce significativamente el número de crisis inducidas por pentilene tetrazol (PTZ) en machos, pero no se obtuvo el mismo efecto en las hembras (Schwartz-Giblin y cols., 1989). Por otro lado, se ha observado que la testosterona tiene un doble dependiendo de la dosis y administración de la hormona. Estudios demuestran que en la primera hora después de la administración de testosterona las DEO disminuyen, pero aumentan en las siguientes dos horas (van Luijtelaaar, Onat, y cols., 2014). Esto se debe ya que al variar las concentraciones de esteroides neuroactivos en el suero, se ve afectada la excitación

neuronal y por ende la ocurrencia de las crisis epilépticas (Herzog y Fowler, 2005). Concluyendo que la testosterona como tal tiene un efecto anticrisis, pero su metabolito activo, posiblemente el androstanediol, tiene un efecto pro-crisis al ser un fuerte modulador del receptor GABA<sub>A</sub> (van Luijtelaar y cols., 2014).

Adicionalmente, en estudios a largo plazo, se ha demostrado en los modelos animales de machos castrados, aumenta la incidencia de las DEO, sugiriendo que la testosterona tiene un efecto protector contra las crisis de ausencia (van Luijtelaar y cols., 1996).

#### 1.4.1.3. Rol del 17 $\beta$ -Estradiol

Los estrógenos son hormonas sintetizadas a partir de andrógenos por medio de la enzima aromatasa (Figura 7; Simpson y cols., 2001). Son esenciales para el funcionamiento del cerebro, principalmente durante el periodo de la diferenciación sexual, ya que producen efectos biológicos importantes en el SNC (McEwen y Alves, 1999). La acción de los estrógenos está mediada por la activación de los receptores directos (ER) intracelulares con acción genómica o por medio de la activación de mecanismos independientes de los receptores membranales. Los receptores para los estrógenos se encuentran en todo el cerebro y se expresan tanto en neuronas como en la glía (Velíšková, 2007).

La posible relación entre los estrógenos y la excitabilidad neuronal fue descrita hace más de 150 años por Locock (Velíšková, 2006). A partir de entonces, se han descrito las variaciones en las crisis epilépticas en mujeres durante su ciclo menstrual, así como un ciclo alterado y además un aumento en la frecuencia de los desórdenes menstruales en mujeres que presentan esta enfermedad (Velíšková, 2006).

Diferentes estudios en animales muestran que el 17 $\beta$ -estradiol tiene efectos cruciales para el crecimiento y diferenciación de los axones y las dendritas, así como para la sinaptogénesis durante la maduración del cerebro (Toran-Allerand, 2004). Una disrupción en la sinaptogénesis puede llevar a cambios en la excitabilidad neuronal. Lo

que a su vez, puede contribuir a la generación de las crisis de ausencia (Swann, Al-Noori, Jiang y Lee, 2000).

En experimentos con ratas hembra, en un modelo de epilepsia inducida por medio de descargas eléctricas en el cerebro, se ha reportado que la administración aguda de  $17\beta$ -estradiol puede aumentar el número de las crisis tónico-clónicas (Velíšková, 2007). Contrario a estos resultados, observaron un aumento de las crisis cuando los niveles de  $17\beta$ -estradiol, durante la fase del proestro, eran altos (Velíšková, 2007).

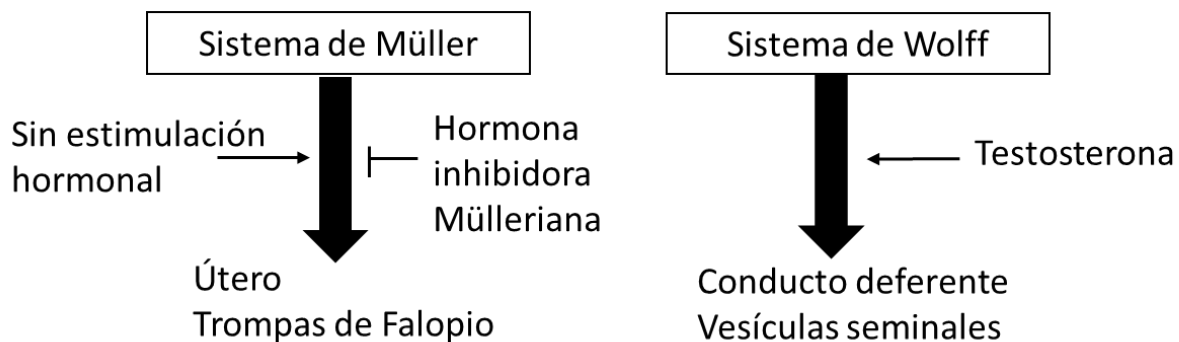
Los efectos opuestos de los estrógenos en los estudios de crisis típicas y atípicas dependen de la duración del tratamiento, las dosis de estrógenos, el estatus hormonal y el tipo de modelo utilizado (Herzog y cols., 1986). Además de que son pocos los estudios en que se ha probado esta hormona en los modelos genéticos de crisis de ausencia (van Lujtelaar y cols., 2014).

#### 1.4.1.4. Diferenciación sexual

La diferenciación sexual del cerebro produce cambios permanentes en las estructuras y funciones del cerebro. En un principio, los efectos organizacionales de la diferenciación sexual desarrollan los órganos sexuales masculinos o femeninos, y posteriormente se lleva a cabo la diferenciación del cerebro, lo cual incluye cambios permanentes, los cuales se refieren a los efectos en el desarrollo, tal como la secreción de hormonas esteroides sexuales que masculinizan y defeminizan los circuitos cerebrales y que desarrollan las conductas copulatorias en la etapa adulta (Numan, 2015; Swaab, 2007). Mientras que los efectos activadores de los esteroides hacen referencia a la acción que tienen sobre circuitos neuronales ya desarrollados afectando sus funciones (Numan, 2015).

Existen dos sistemas primordiales con respecto al desarrollo del tracto interno reproductivo: el sistema de Müller o paramesonéfrico (hembra) y el sistema de Wolff o mesonéfrico (macho). El sistema de Müller se desarrolla en ausencia de testosterona, es decir, la feminización del cerebro es independiente de la secreción hormonal. Mientras

la masculinización, o el desarrollo del sistema de Wolff, es un proceso que sí requiere la secreción hormonal de los órganos sexuales masculinos en periodos perinatales (Nugent y cols. 2015; Numan, 2015). El control hormonal da paso a dos patrones morfológicos del cerebro. Sin embargo, los segundos mensajeros, neuroesteroides y neurotransmisores también juegan un papel importante en el desarrollo y en las diferencias conductuales entre los sexos (Segovia y cols., 1999).



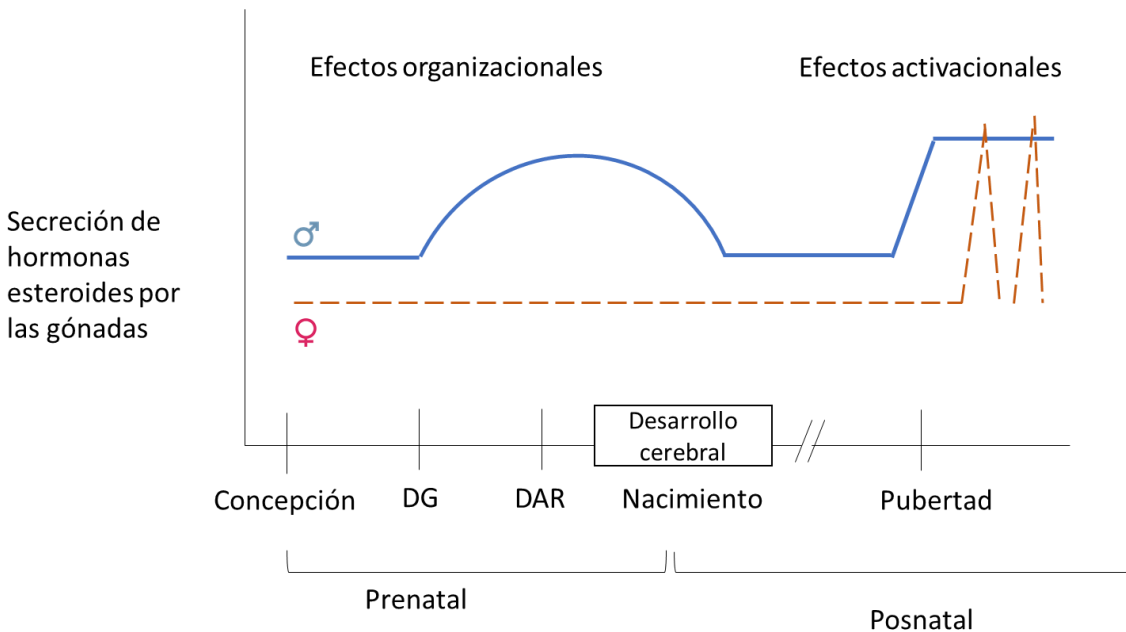
**Figura 8. Desarrollo del tracto reproductivo en mamíferos.** La secreción de testosterona a través de los testículos estimula el desarrollo del conducto deferente y la vesícula seminal, lo que a su vez estimula el desarrollo de los genitales exteriores (pene y escroto). La secreción de la hormona inhibidora Mülleriana por los testículos, inhibe el desarrollo del sistema de Müller. Modificado de Numan, 2015.

Las secreciones de los testículos durante la primera semana postnatal masculinizan o defeminizan el cerebro mientras que las secreciones de los ovarios durante la tercera semana postnatal feminizan por completo el cerebro (véase Figura 8). Una vez que las gónadas se desarrollan, el desarrollo de los tractos reproductivos está determinado por el ambiente hormonal (Numan, 2015).

Las hormonas masculinas perinatales previenen la muerte celular de las neuronas en el núcleo del área preóptica medial (Numan, 2015). Estas proyectan al núcleo ventromedial del hipotálamo, el cual media el reflejo de lordosis en la hembra, constituido principalmente por neuronas GABAérgicas (Numan, 2015).



Los principales núcleos cerebrales que presentan un dimorfismo sexual son: el bulbo olfatorio accesorio, el núcleo medial y posteromedial de la amígdala medial, el núcleo del lecho de la estría terminal y varios núcleos hipotalámicos (Segovia y cols., 1999).



**Figura 9. Representación de las secreciones de esteroides de las gónadas en machos (línea azul) y hembras (línea punteada naranja) durante su vida.** Para la hembra, la ausencia de hormonas sexuales masculinas en las etapas prenatales resulta en el desarrollo del aparato reproductor femenino y en la feminización del cerebro; la secreción hormonal de esteroides de los ovarios comienza hasta la pubertad en forma de ciclos (en la gráfica se muestran como picos). Para los machos, los testículos secretan hormonas durante el desarrollo prenatal y en los primeros días del periodo posnatal, y sus efectos promueven el desarrollo del aparato reproductor masculino, así como la masculinización y defeminización de los circuitos cerebrales. DG = desarrollo gonadal; DAR= desarrollo del aparato reproductor. Modificado de Numan, 2015.

Los cambios permanentes que se llevan a cabo en los periodos perinatales y posnatales en estructuras y funciones cerebrales, pueden dar lugar a las diferencias en cuanto al número y la susceptibilidad a las crisis, tanto en humanos como en los modelos animales (Horn y Buterbaugh, 1986b).

La mayoría de las investigaciones en torno a la diferenciación sexual se centran en estudiar el comportamiento variando la concentración de las hormonas en diferentes

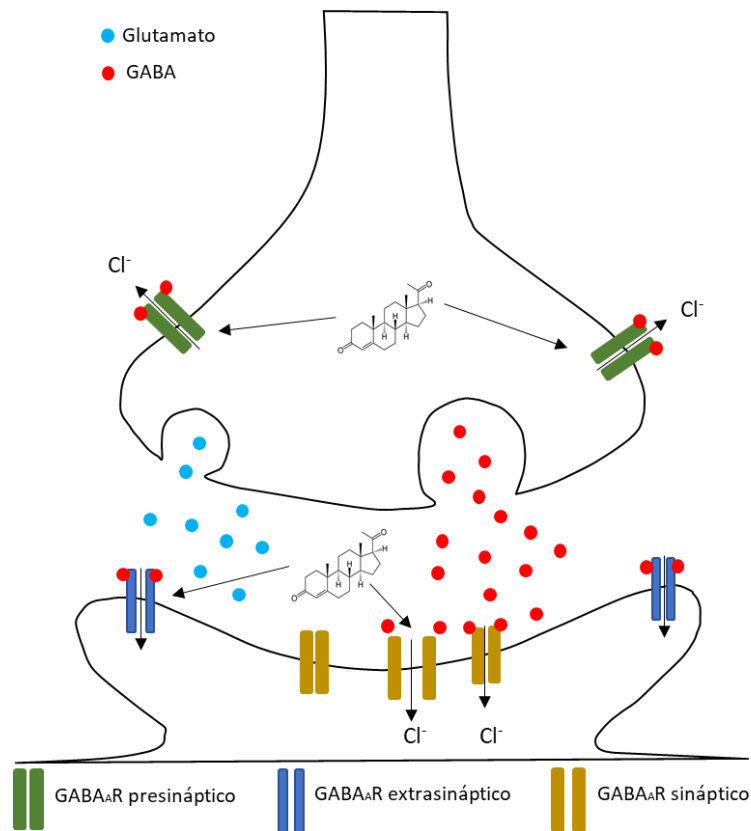
etapas del desarrollo. Sin embargo, no se han estudiado los efectos organizacionales del cerebro en la incidencia de las crisis de ausencia a la fecha.

## 1.5. El Sistema GABAérgico

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC en mamíferos. Es un aminoácido que se sintetiza a partir del ácido glutámico por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (Cooper y cols., 2003). El GABA causa una hiperpolarización en las neuronas y es metabolizado en el sitio intracelular o en las neuronas postsinápticas (Cooper y cols., 2003).

Los receptores para el GABA en especies vertebradas se encuentran principalmente en las membranas de las células nerviosas. Sin embargo, sus receptores no se encuentran únicamente en neuronas, sino que también tiene receptores en astrocitos como reguladores de los canales de cloro, e inclusive fuera del SNC (Cooper y cols., 2003). Los receptores pueden ser de tres tipos:

- GABA<sub>A</sub>: Es un receptor ionotrópico ligado a un canal de cloro que atraviesa la membrana celular formado por dos subunidades  $\alpha$ , dos  $\beta$ , y una  $\delta$ . También tiene sitios de unión para benzodiazepinas, barbitúricos y esteroides (véase Figura 10) (Bormann, 2000).
- GABA<sub>B</sub>: Es un receptor metabotrópico acoplado a una proteína G encargada de mediar las respuestas de inhibición de una manera más lenta y prologada que las GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> (Bormann, 2000; Martín-lópez y Francisco, 2009).
- GABA<sub>C</sub>: Es un receptor ionotrópico ligado a un canal de cloro. Compuesto de cinco subunidades  $\rho$  (Bormann, 2000).



**Figura 10. Interacciones entre los receptores de GABA<sub>A</sub> y la progesterona.** Se cree que los metabolitos de la progesterona pueden tener un papel más importante en la activación del receptor de GABA<sub>A</sub>, aumentando el eflujo de cloro y despolarizando la membrana. Modificado de Rotstein, 2011.

Existe una gran variedad de fármacos antiepilépticos que actúan a través del receptor GABA<sub>A</sub>, incrementando su acción inhibitoria en las neuronas (Eguibar y Cortés, 2010b). En modelos animales de crisis de ausencia se ha observado una disminución de las descargas espiga-onda al inyectar el antagonista de GABA<sub>B</sub>, como el 2-hidroxisaclofen, y suprimir los potenciales postsinápticos inhibitorios sobre las neuronas tálamo-corticales (Marescaux y Vergnes, 1995; Vergnes y cols., 1982).

Se ha demostrado que las hormonas esteroides son capaces de modificar la expresión de la subunidad del receptor de GABA<sub>A</sub>, la cual modula el desarrollo de las DEO (van Luijtelaaar y cols., 2014). A pesar de que la mayoría de los esteroides ejercen su actividad biológica por medio de efectos genómicos directos, existe evidencia de que sus acciones van más allá de ser reguladores transcripcionales, por ejemplo: las interacciones que

promueven la actividad de receptor producen efectos sedantes-hipnóticos mediada por el receptor GABA<sub>A</sub> en el animal (Greenspan, 2012).

El receptor de GABA<sub>A</sub> juega un papel crucial en la generación de crisis de ausencia. Por lo tanto, los cambios fisiológicos o de expresión dependientes del sexo en estos receptores contribuyen a una mayor o menor incidencia de las DEO en modelos de crisis de ausencia (van Lujtelaar y cols., 2014). Aquellos esteroides o antiepilépticos que actúan como moduladores positivos o agonistas del receptor de GABA<sub>A</sub> aumentan la frecuencia y duración de las crisis de ausencia en los modelos animales como las ratas WAG/Rij y las GAERS, es decir, la activación general del sistema GABAérgico conlleva a un aumento en las crisis de ausencia tanto en humanos como ratas (Tolmacheva y van Lujtelaar, 2007).

## 1.6. Modelos animales de crisis de ausencia

Existen dos tipos modelos animales para el estudio de las crisis de ausencia: los inducidos por medio de un fármaco y los genéticos. Entre los modelos farmacológicos se encuentran los inducidos mediante la administración sistémica de AY-9944 (1,4-bis[2-clorobenzilaminometil]-ciclohexano diclorohidrato), un inhibidor de la síntesis de colesterol; la administración sistémica pentilenetetrazol, un antagonista no competitivo de los receptores GABA<sub>A</sub>; o por la administración del gaboxadol, un agonista de los receptores GABA<sub>A</sub> (Eguibar y Cortés, 2010a; Ibarra-Hernández, 2018).

Existen diferentes tipos de crisis de ausencia, pero los más difíciles de controlar son aquellos de origen genético, por lo que estos modelos animales representan una oportunidad para investigar los mecanismos fisiopatológicos y epileptogénicos para mejorar los tratamientos actuales.

Los modelos animales más utilizados para el estudio de las crisis de ausencia son los roedores (Eguibar y Cortés, 2010). La incidencia de crisis de ausencia dependiente del sexo varía entre cada modelo. A continuación, se muestra una tabla con el fenotipo dependiente del sexo entre los modelos de roedores más utilizados:

**Tabla 1. Diferencias fenotípicas dependientes del sexo en ratas y ratones con crisis de ausencia**

<b>Especie</b>	<b>Modelo animal</b>	<b>Fenotipo dependiente del sexo</b>	<b>Referencia</b>
Rata	Noruega café (Brown Norway)	Los machos tienen una mayor prevalencia, con DEO más frecuentes, con mayor duración y de mayor intensidad	(Jando' y cols., 1995)
Rata	Long-Evans tratadas con AY9944	Las crisis de ausencia atípicas tienen mayor duración en las hembras que en los machos; la diferencia entre ambos sexos se da después de la pubertad	(Cortez, Cunnane, y Snead, 2002; Persad, Cortez, y Snead, 2002)
Rata	Wistar tratadas con bicuculina	Las DEO con frecuencia de 5-6 Hz se presentan en el 70% de los machos y en el 100% de las hembras, con y sin ovariectomía. Las hembras presentan una menor latencia para presentar las descargas.	(Matejovska, Veliskova, y Velisek, 1998)
Ratón	Deleción heterocigótica de Gabrb3	Los machos presentan un incremento en las DEO espontáneas, así como un deterioro en la memoria en comparación con las hembras	(Liljelund, Handforth, Homanics, y Olsen, 2005)
Ratón	Deleción heterocigótica de Gabra1	Las hembras presentan una pérdida de peso y masa corporal junto con un incremento en las DEO en comparación con los machos.	(Arain, Boyd, y Gallagher, 2012)

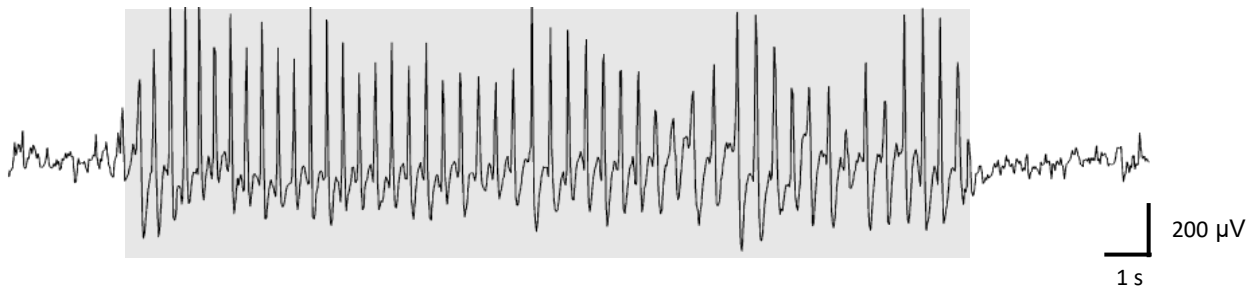
Note los dimorfismos sexuales entre diferentes modelos animales. DEO=Descarga espiga-onda. AY-9944=1,4-bis[2-clorobenzilaminometil]-ciclohexano diclorohidrato, Gabrb3=Gen que codifica para la subunidad beta-3 del receptor GABA<sub>A</sub>. Gabra1=Gen que codifica para la subunidad alfa-1 del receptor GABA<sub>A</sub>. Modificado de van Luijtelaar, Gilles; Yilmaz Onat, Filiz; Gallagher 2014.

En cuanto a los modelos genéticos de crisis de ausencia se encuentran aquellos que presentan mutaciones en un solo gen, como son: el ratón letárgico, el ratón Stargazer, el ratón Tottering, el ratón Leaner, el ratón Mocha y el ratón Ducky (Eguibar y Cortés, 2010a). Además, existen modelos genéticos de roedores que poseen mutaciones poligénicas como: la rata GAERS (de sus siglas en inglés "Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg), la rata WAG/Rij (de sus siglas en inglés Wistar Albino

Glaxo/Rijswijk Rat) y la rata *taiep*, del acrónimo de temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis (Eguibar y Cortés, 2010b; Holmgren, y cols., 1989).

### 1.6.1. La rata Genetic Absence Epilepsy from Strasbourg (GAERS)

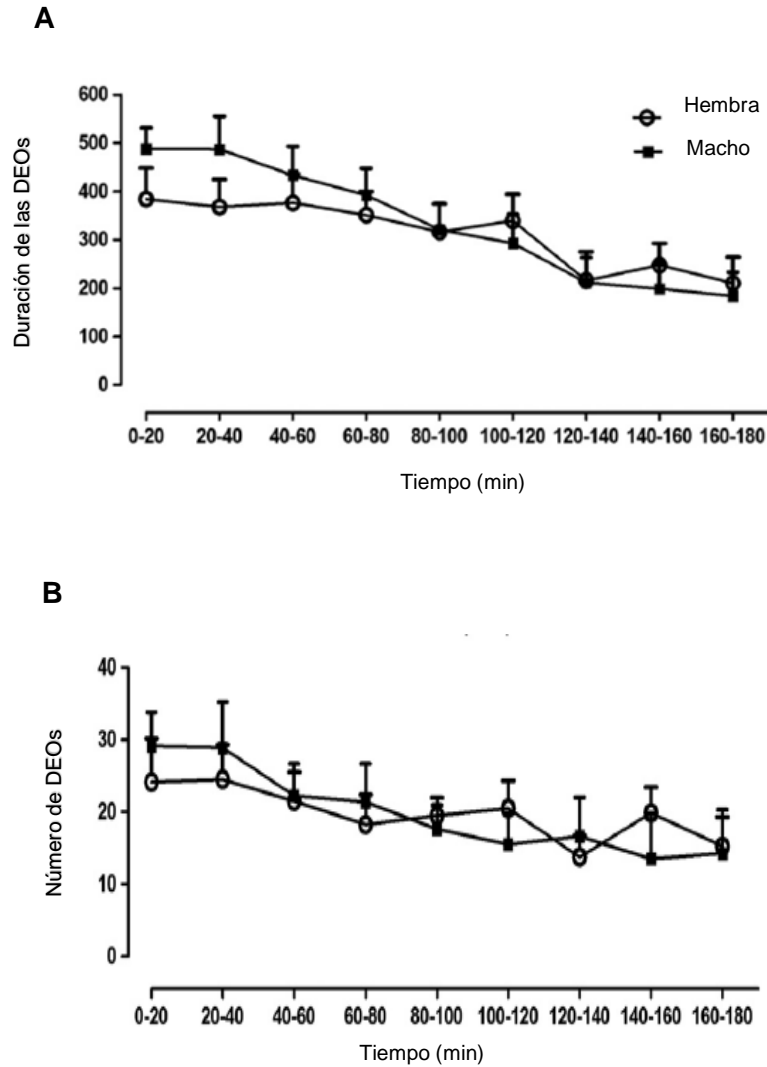
Este modelo de crisis de ausencia surgió de manera espontánea a partir de ratas de la cepa Wistar adultas en el grupo de investigación de Vergnes y colaboradores en 1982 mientras estudiaban modelos farmacológicos de epilepsia. Ellos observaron que aproximadamente un 30% de las ratas adultas presentaban DEO (Malafosse, 1994). La caracterización de las crisis de ausencia en las ratas GAERS se hizo a través de electroencefalografía, obteniendo en el análisis el patrón característico de las crisis de ausencia, esto es: el patrón espiga-onda bilateral y sincrónico con una frecuencia de 7 a 8 Hz, acompañada de una interrupción del comportamiento (Marescaux y cols., 1992). La cepa fue nombrada Ratas Genéticamente Propensas a Crisis de Ausencia de Estrasburgo o Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) por sus siglas en inglés y hoy en día se utiliza como modelo animal para el estudio de las crisis de ausencia genética.



**Figura 11. Registro encefalográfico bipolar de la rata GAERS en la corteza durante una crisis de ausencia.** Se observa el patrón espiga-onda. Se resalta con gris la crisis de ausencia caracterizada por la forma espiga-onda. Modificado de Kovács y cols., 2014.

Existen diferencias sexo-dependientes del modelo animal utilizado. La rata GAERS presenta un dimorfismo sexual ya que los machos comienzan sus crisis con una menor duración. Sin embargo, esta diferencia disminuye conforme el animal crece. En realidad, se han realizado pocos estudios para confirmar este dimorfismo sexual y no existen

estudios en los que evalúen la variación de DEO a través del ciclo estral de este tipo de ratas (Figura 12; van Lujtelaar, Onat, y cols., 2014).

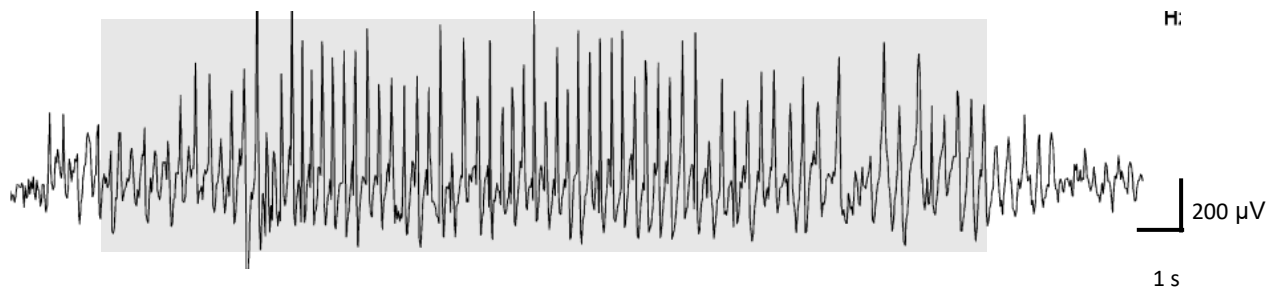


**Figura 12. Promedio de duración y número de DEO en ratas GAERS machos y hembras cada 20 minutos durante 3 horas. A)** Duración de las descargas. Se observa que los machos comienzan con DEO de mayor duración, pero conforme avanza el registro esta diferencia se atenúa. **B)** Número de las DEO. Estas no variaron de forma significativa con el tiempo. Note que no hay diferencia entre los sexos en duración ni en número de crisis. Modificado de van Lujtelaar, Onat, y cols., 2014.

### 1.6.2. Las ratas Wistar Albino Glaxo de Rijswijk (WAG/Rij)

La rata WAG/Rij surgió en los Países Bajos, en la ciudad de Rijswijk por el instituto REPGO. Estas ratas se han reproducido por más de 100 generaciones, haciendo que sean homocigóticas (Festing, 1979). Sus manifestaciones clínicas y electroencefalográficas se asemejan fuertemente a los de otros modelos de crisis de ausencia, por lo que es ampliamente utilizada como un modelo genético (Coenen y Van Luijtelaar, 1987).

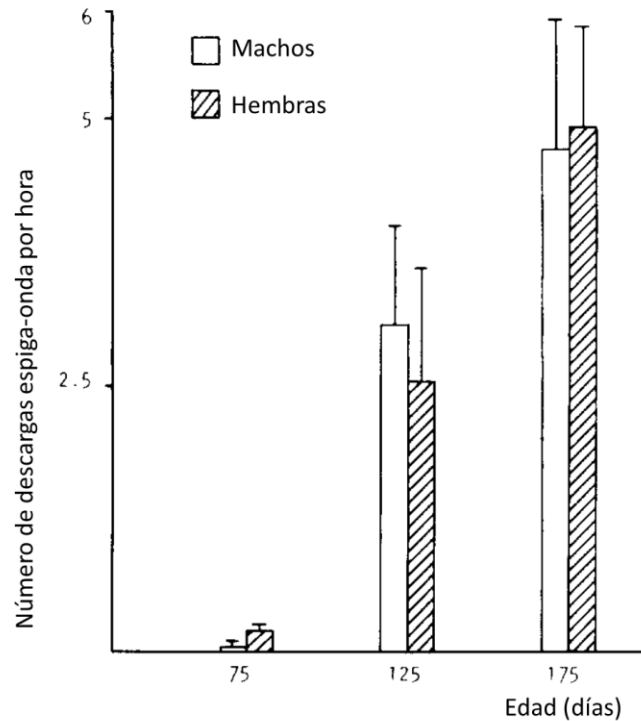
La rata WAG/Rij presenta unas DEO con una frecuencia de 8-10 Hz y comienzan a los 60-80 días de edad (Figura 13; Coenen y Van Luijtelaar, 1987, 2003).



**Figura 13. Registro encefalográfico bipolar de la rata WAG/Rij durante una crisis de ausencia.** Se resalta con gris la crisis de ausencia donde se observa el patrón espiga-onda. Modificado de Kovács y cols., 2014.

En la rata WAG/Rij no se ha observado diferencia en la incidencia, frecuencia o duración de DEO dependientes del sexo. Este análisis se realizó por el grupo de Coenen y cols. en 1987 y se estudiaron tanto ratas jóvenes (75 días) como ratas adultas (125 y 175 días) (véase Figura 14; van Luijtelaar y cols., 2014).





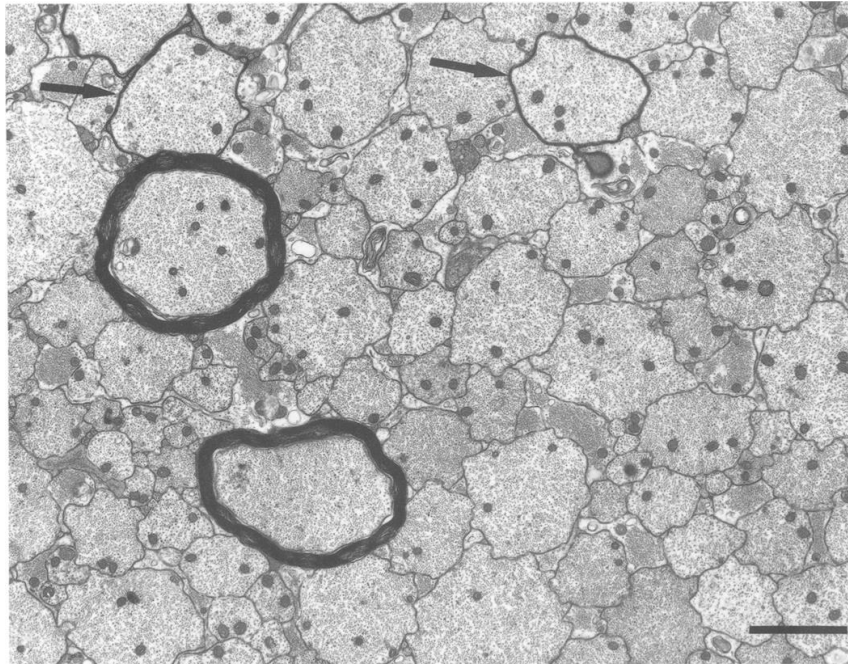
**Figura 14. Número de DEO de ratas macho y hembra WAG/Rij a los 75, 125 y 175 días de edad.** Se observa que el ligero dimorfismo sexual presente en el día 125 disminuye con la edad. Note que no hay diferencia entre los sexos. Modificado de van Luijtelaaar y cols., 2014.

Adicionalmente, se ha estudiado la influencia de las hormonas sexuales en las crisis de ausencia en este modelo genético, observando que las ratas hembras ovariectomizadas presentan una mayor incidencia y una mayor duración de las DEO (Yildiz y cols., 2011). Por otro lado, al estudiar el efecto del ciclo estral en las crisis, se ha observado que las DEO tienen una distribución circadiana con una acrofase al principio del periodo de oscuridad y que el número de crisis aumenta en el día proestro (Van Luijtelaaar y cols., 2001).

### 1.6.3. La rata *taiep*

La rata *taiep* proviene de una mutante espontánea de característica autosómica recesiva que se dio a partir de cruces endogámicos de la cepa Sprague-Dawley para obtener ratas

con una alta frecuencia de bostezo en el Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta (LNC) del Instituto de Fisiología en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Holmgren y cols., 1989). El nombre “*taiep*” es un acrónimo de sus principales síntomas: temblor, ataxia, episodios de inmovilidad, epilepsia y parálisis (Holmgren y cols., 1989).



**Figura 15. Microscopía electrónica de ratas *taiep* de 12 meses.** Se observan dos axones con una vaina de mielina correctamente compactada de color oscuro intenso. Por otro lado, señalado con flechas, se observan dos axones amielínicos. También se observa que la mayoría de los axones se encuentran desmielinizados. Barras de escala = 2.0  $\mu$ m. Tomado de Duncan y cols., 1992.

El fenotipo que presenta la rata *taiep* se debe a una mutación en el cromosoma 9 de la rata, en un sitio cercano a las kinesinas y dineínas de los microtúbulos. En 2017, Duncan y colaboradores realizaron experimentos, donde por medio de técnicas moleculares como PCR e inmunoprecipitación de cromatina (ChIP de sus siglas en inglés “Chromatin Immunoprecipitation”) pudieron identificar el polimorfismo de nucleótido simple (SNP por sus siglas en inglés “Single Nucleotide Polimorfism”) responsable de la mutación en el gen *Tubb4a* en la rata *taiep*. (Duncan y cols., 2017). Este gen se expresa principalmente en el cerebro, sobre todo en las células oligodendrocíticas y codifica para la proteína  $\beta$ -

tubulina, la cual dimeriza con la proteína  $\alpha$ -tubulina. Esta mutación se da en un aminoácido esencial para la dimerización de la  $\beta$ -tubulina y aumenta la cantidad de los microtúbulos en el citoplasma de los oligodendrocitos (Duncan y cols., 2017). La acumulación de microtúbulos en el citoplasma altera los mecanismos de transporte desde el retículo endoplásmico hacia la porción cis del aparato de Golgi, como fue propuesto por Coure y cols., en 1997, lo que hace que las proteínas encargadas de la mielinización de los axones en el sistema nervioso central (SNC) como son: la proteína básica de mielina (PBM), la proteína proteolipídica (PPL), la glicoproteína asociada a la mielina (GAM) y la proteína fosfodiesterasa (CNP) tengan niveles subnormales al mes de edad y que decrezcan con la edad hasta el año de vida (Möller y cols., 2002; O'Connor y cols., 2000). Esta alteración provoca que la rata *taiep* presente una hipomielinización inicial seguido de una desmielinización progresiva del SNC, ocasionando que las interacciones glía-neurona se vean alteradas y con esto, la transmisión sináptica de señales eléctricas y de neurotransmisores en diferentes vías neuronales (Figura 15; Bonasco y cols., 2008; Fuenzalida y cols., 2009).

El primer signo del síndrome motor progresivo que presenta la rata *taiep* es el temblor, el cual aparece en el primer mes de vida y con el tiempo aumenta en su amplitud, pero decrece en la frecuencia (Holmgren y cols., 1989). Posteriormente se presenta la ataxia, que se presenta a los cuatro meses de edad. Seguido de los episodios de inmovilidad, los cuales inician a los seis meses, y pueden presentarse de manera espontánea o inducida al sujetarlas de manera súbita por la cola o el tórax durante los episodios de inmovilidad. El patrón encefalográfico simula a lo mostrado en el sueño con movimientos oculares rápidos (Cortés y cols., 2005).

Las ratas *taiep* presentan en la corteza cerebral unas descargas tipo espiga-onda con una frecuencia de 4 a 8 Hz, similares a las que se muestran en los otros modelos genéticos de crisis de ausencia, como son la rata GAERS y la rata WAG/Rij (Eguibar y Cortés, 2010). Pero de manera característica presenta un dimorfismo sexual ya que las DEO se presentan desde los 3 meses en machos y hasta los 6 meses en las hembras (Ibarra-Hernández, 2018).

El objetivo del presente trabajo de tesis fue el de analizar el papel que tienen las hormonas sexuales, específicamente la progesterona, testosterona y el  $17\beta$ -estradiol al administrarlas de forma sistémica aguda sobre las crisis de ausencia en las ratas *taiep* macho adultas jóvenes en animales castrados en la etapa adulta y en la etapa neonatal a los 5 días posteriores al nacimiento.

## 2. Justificación

Actualmente se considera a la epilepsia como uno de los trastornos neurológicos más frecuentes, afectando a millones de personas a nivel mundial (Fisher y cols., 2017). Se calcula que en México hay dos millones de personas con epilepsia, de los cuales alrededor de 63 mil corresponde a crisis de ausencia, ocasionando problemas no sólo neurológicos, sino también psicológicos, económicos, de salud y sociales (Secretaría de Salud, 2016).

Existen pocos estudios en los que se observe de manera clara la importancia que tienen las hormonas sexuales esteroides sobre las crisis de ausencia. Específicamente en modelos animales existen muchas variantes con respecto a los resultados (van Luijtelaa, Onat y cols., 2014). El dimorfismo sexual que presenta la rata *taiep* nos brinda una oportunidad única para investigar la importancia de las hormonas sexuales tanto masculinas como femeninas en la incidencia de crisis de ausencia, dado que se ha reportado la dependencia de las variables fisiológicas como son el ciclo estral, la maduración y el declive sexual.

## 3. Hipótesis

H<sub>1</sub>: La diferenciación sexual del cerebro en etapas posnatales tiene efectos sobre la incidencia de las crisis de ausencia en la rata *taiep*

H<sub>2</sub>: Las hormonas esteroides sexuales modifican la frecuencia y la duración de las crisis de ausencia en la edad adulta

## 4. Objetivos

Objetivo general

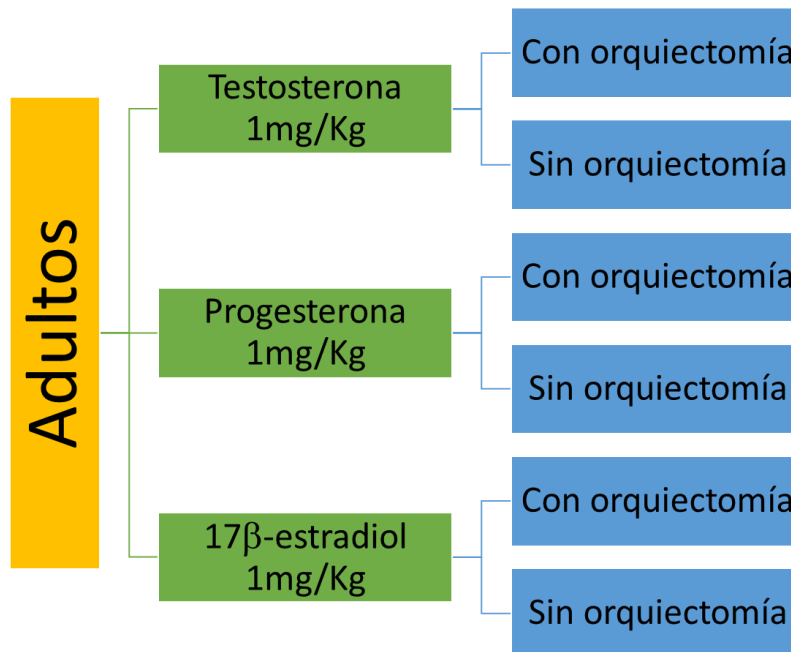
- Evaluar la influencia de las hormonas esteroides sexuales sobre las crisis de ausencia en ratas mutantes de mielina *taiep* macho adultas.

Objetivos específicos

- Analizar el efecto de la orquiectomía en ratas macho neonatales (etapa activacional) y adultas (periodo organizacional) sobre las características de las crisis de ausencia.

- Determinar el efecto de la progesterona al ser administradas en dosis agudas de 1mg/Kg sobre a la duración y frecuencia de las crisis de ausencia en ratas macho *taiep* intactas y gonadectomizadas.
- Determinar el efecto de la testosterona al ser administrada en dosis agudas de 1mg/Kg sobre la duración y frecuencia de las crisis de ausencia en ratas macho *taiep* intactas y gonadectomizadas.
- Determinar el efecto de la 17 $\beta$ -estradiol al ser administrada en dosis agudas de 1mg/Kg sobre la duración y frecuencia de las crisis de ausencia en ratas macho *taiep* intactas y gonadectomizadas

## 5. Metodología



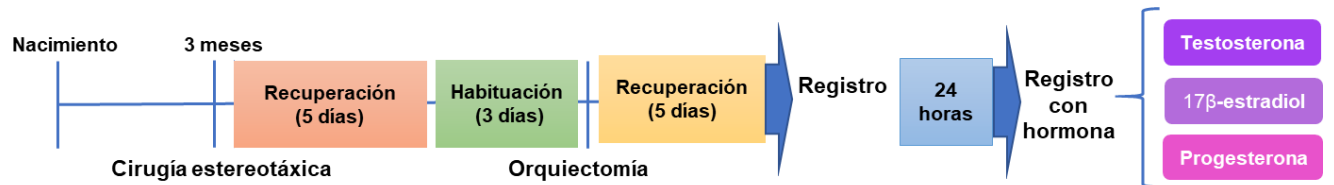
**Figura 16. Grupos experimentales.** Únicamente al grupo de machos jóvenes adultos se les administran las hormonas testosterona, progesterona y 17 $\beta$ -estradiol en dosis de 1mg/Kg. Las hormonas se administran a los grupos con orquiectomía y grupos control sin cirugía simulada.

### 5.1. Sujetos

Se emplearon 24 ratas *taiep* macho adultas de tres meses en un rango de peso de 300  $\pm$  20 gramos. Las ratas se mantienen en un ciclo de luz/oscuridad 12:12 con encendido

de luces a las 0700, con agua purificada Ciel™(Coca Cola Co.) y alimento balanceado para roedores (LabDiet 5008, Estados Unidos de América) *ad libitum* en una caja de acrílico transparente de 40 cm de alto, 30 cm de ancho y 45 cm de largo a una temperatura de 22°C ± 2°C y una humedad relativa de entre 35-50%. Se sigue la NOM-061-ZOO-1999 de la SAGARPA y con la guía del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH por sus siglas en inglés; National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011). El protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, COSM-SAL-17-I.

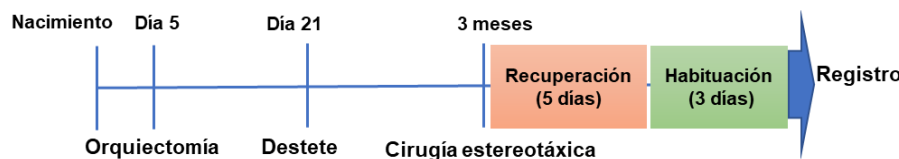
**A**



**B**



**C**



**Figura 17. Metodología para el registro encefalográfico de las crisis de ausencia. A)** Metodología para el registro de adultos con orquiectomía. **B)** Metodología para el registro del grupo de adultos sin orquiectomía. **C)** Metodología para el registro del grupo de neonatales con orquiectomía. Las ratas neonatales se mantienen con la madre hasta el destete (día posnatal 21).

Los grupos se dividieron en: adultos con orquiectomía, adultos sin orquiectomía y neonatales con orquiectomía. El grupo control sin orquiectomía y el grupo de adultos con orquiectomía a su vez se dividen en grupos control y en los grupos tratados con las hormonas, las cuales son testosterona, progesterona y  $17\beta$ - estradiol en dosis de 1mg/Kg y con 4 sujetos para cada hormona. Para el grupo con orquiectomía neonatal sólo se obtienen registros control sin hormonas con 8 sujetos (véase Figura 17).

## 5.2. Implantes estereotáxicos

Previo a la cirugía se realizaron mediante el implante de los electrodos de acero inoxidable. Los electrodos van unidos a un conector múltiple de la siguiente manera:

1. Músculo
2. Músculo
3. Occipital
4. Ocular
5. Parietal
6. Frontal

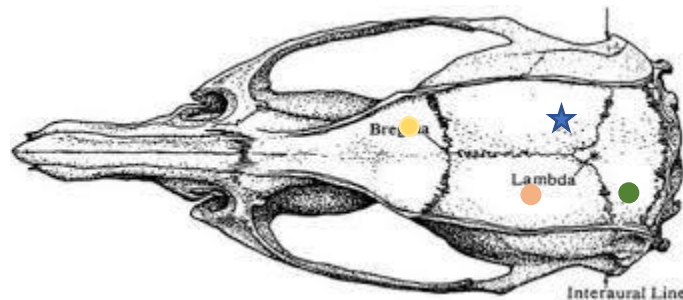
Para anestesiar a los animales se empleó Ketamina (75 mg/Kg) combinado con Xilacina (5 mg/Kg) por vía intraperitoneal. A lo largo del procedimiento se evaluó la respiración y los reflejos ante estímulos aversivos en la punta de la cola para determinar un nivel adecuado de anestesia. El sujeto se pone sobre un colchón calefactor (Kaz Inc., Estados Unidos de América) para mantenerlo a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y se monta en el aparato estereotáxico tipo Kopf (Stoeting Co., Estados Unidos de América), asegurando cada barra para que el oído se encuentre en el meato auditivo externo del animal. La cabeza del animal no se debe mover hacia los lados y se fija la maxilar superior mediante la barra para los incisivos. Se realiza una incisión media con un escalpelo #4 y una hoja de bisturí #20 a lo largo del cráneo, se remueve el periostio con una legra y utilizando las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2007) se realizan trépanos con un taladro de mano dirigidos a las cortezas cerebrales parietal y occipital del lado izquierdo y del lado derecho, así como para la región CA1 del hipocampo y en la corteza frontal que se



empleará como tierra eléctrica (véase Figura 18; Eguibar y Cortés, 2010a). Se midió la posición de Bregma y Lambda y se ajustan a la misma altura con referencia al plano dorso-ventral. Para el registro de la corteza cerebral se implantan tornillos de acero inoxidable. Para el hipocampo se implantó un electrodo bipolar trenzado. Para el registro electromiográfico se implantaron dos electrodos en los músculos de la nuca y uno en la parte superior de la órbita ocular para el registro electrooculográfico. Los electrodos se fijan al cráneo con acrílico dental. Las coordenadas que se siguieron para el implante fueron los siguientes:

**Tabla 2. Coordenadas que se siguen para colocar el electrodo de hipocampo con respecto al punto bregma de la rata.**

Ejes	Bregma
Anteroposterior	-4 mm
Latero-medial	-2.5 mm
Dorsoventral	-2.5 mm



**Figura 18. Localización de los electrodos en el registro.** Se marca con un punto amarillo el lugar en el cual se realiza el trépano para el electrodo frontal de referencia, con naranja para el electrodo parietal, con verde para el electrodo occipital y con la estrella donde se coloca el electrodo de hipocampo siguiendo las coordenadas anteriores. Mm= milímetros.

Después de la operación se dejó 5 días en recuperación del animal y se le administró Meclumina de Flunixin (Napzin®) 0.2mg/Kg como analgésico y Enrofloxacin (Enroxil®) 0.015mg/Kg al 5% como antibiótico administrado por vía subcutánea (s.c).

### 5.3. Habitación

Después de la recuperación, los animales se habituaron conectando el implante bajo condiciones similares a las cuales se tendrán durante el registro durante tres días seguidos por tres horas. Se mantienen con acceso de agua y alimento *ad libitum* en una caja de transparente de acrílico en condiciones controladas con un ciclo de luz-oscuridad 12:12 y una temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa de entre 35-50% en un cuarto con sonido amortiguado.

### 5.4. Orquiectomía

#### 4.4.1 Adultos

Se utilizó Ketamina (75 mg/Kg) y Xilacina (5 mg/Kg) para inducir anestesia. Se tricotomizó el área perigenital con una rasuradora eléctrica (Osner™, Estados Unidos de América) y se coloca a la rata en una tabla quirúrgica (Stoeling Co. Estados Unidos de América). Se desinfectó el área escrotal con una torunda de algodón empleando yodopovidona (Isodine™). Posteriormente se hizo una incisión en el saco escrotal, la cual se encuentra entre la región inguinal y el ano, para exteriorizar el testículo utilizando un mango de bisturí No.4 y hoja de bisturí No.20. Una vez expuesto el testículo se ligaron los cordones neuro-vasculares y el conducto deferente utilizando una sutura absorbible “000” y se cortó el testículo verificando que no hubiese hemorragia. Se realizó el mismo procedimiento quirúrgico para el otro testículo. Una vez que se extrajeron ambos testículos se realizó una sutura con hilo de nicromio “0000” en cada escroto y se limpió el área con yodopovidona. Posteriormente se le administró Meglumina de Flunixin (Napzin®) 0.2mg/Kg como analgésico y Enrofloxacina (Enroxil®) 0.015mg/Kg al 5% como antibiótico durante cinco días.

#### 4.4.2 Neonatales

Se anestesiaron las ratas por hipotermia al hacer una inmersión en hielo frappé en un riñón quirúrgico de aluminio. Se realizó una incisión en el área escrotal con una hoja de bisturí No.24, se exteriorizaron los testículos y se retiraron con ayuda de unas pinzas de punta fina tipo mosquito. Se afrontaron los bordes del epitelio y se adhirieron con cianoacrilato (Kola Loka ®).

#### 5.5. Registro

Posterior a la recuperación y habituación se realizó el registro electroencefalográfico, electrooculográfico y electromiográfico durante 24 horas sincronizado a una videofilmación en un cuarto aislado con el mismo ciclo luz/oscuridad 12:12, utilizando el programa GRAEL, la señal fue amplificada y filtrada utilizando un filtro notch de 1.5 Hz a 30 Hz para el electroencefalograma, de 30 Hz a 99 Hz para el electromiograma y de 0.5 Hz a 4 Hz para el electrooculograma. Los registros comenzaron a las 08:00 horas. Las descargas tipo espiga-onda se analizaron de forma manual. El registro control se realizó sin administración de la hormona, y el registro con hormona se realizó después de la administración por vía subcutánea a una concentración de 1mg/Kg.

Los criterios para identificar las descargas espiga-onda fueron los siguientes:

1. La actividad debía presentarse en todos los canales electroencefalográficos.
2. La duración de las descargas espiga-onda debía ser mayor a 1 segundo.
3. La frecuencia debía estar en el rango de entre 4 a 8 Hz.
4. Conductualmente el animal debía permanece quieto.

Una vez identificadas las descargas espiga-onda, se cuantificó:

- La frecuencia de crisis de ausencia cada dos horas.
- La duración de las crisis de ausencia.
- La latencia de la primera crisis.

## 5.6. Análisis estadístico

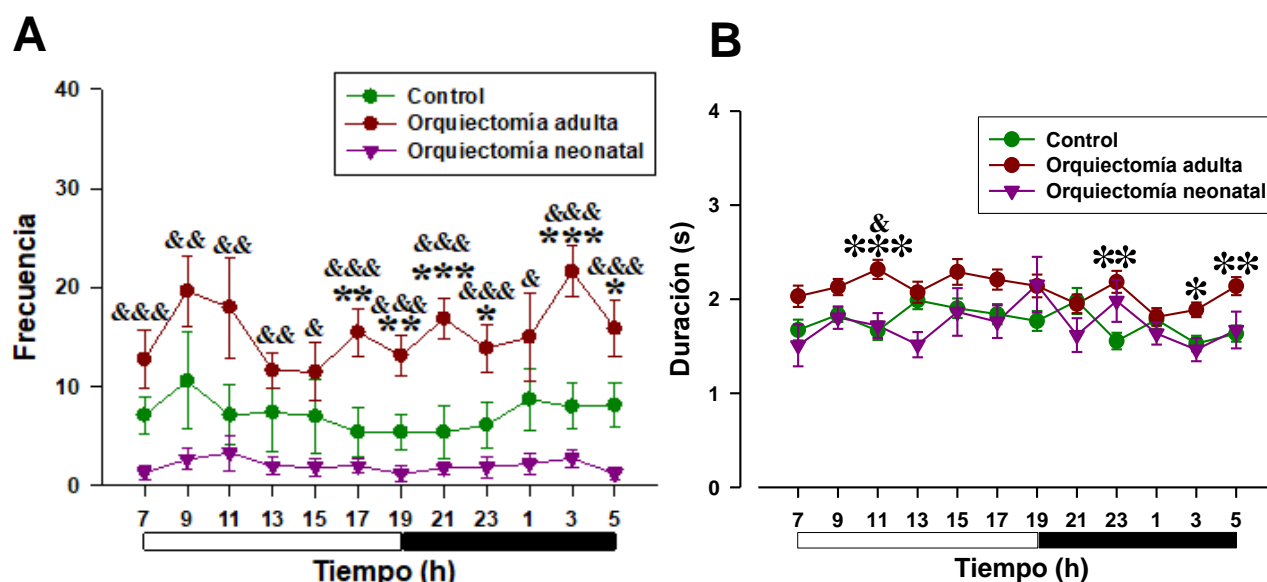
Utilizando el programa estadístico Sigma Plot (Systat Software Inc., Estados Unidos de América) versión 13.0 se graficó la media  $\pm$  error estándar de la media de la frecuencia y duración de las crisis de ausencia cada dos horas de cada grupo con los diferentes tratamientos hormonales.

La frecuencia, la duración y la latencia se analizaron en el programa estadístico SPSS versión 22.0 mediante una prueba *t* de student para muestras independientes cuando se compararon únicamente dos grupos o mediante la prueba de varianza de medidas repetidas (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple Bonferroni cuando se compararon más de dos grupos. Se consideró como diferencia significativa cuando  $P \leq 0.05$ .

## 6. Resultados

### 6.1. Frecuencia, duración y latencia de las crisis de ausencia con orquiectomía neonatal y adulta

La orquiectomía neonatal disminuyó significativamente la frecuencia de crisis de ausencia, mientras la orquiectomía adulta las aumentó. Esta frecuencia aumentó hasta 210% a las 21:00 al comparar el grupo control con el grupo con orquiectomía adulta. En cuanto al grupo con orquiectomía neonatal, se obtuvo una disminución significativa de las crisis al compararlo con el grupo con orquiectomía adulta, que fue desde  $187.88 \pm 24.74$  hasta  $24.44 \pm 8.68$  crisis, (ANOVA seguido de una prueba Bonferroni,  $F_{(2)} = 15.271$ ,  $P < 0.001$ ).

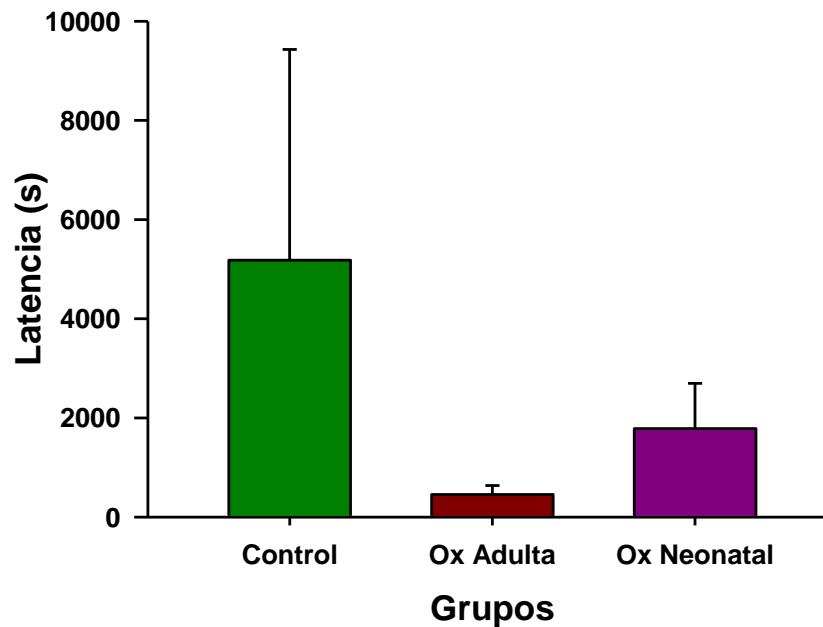


**Figura 19. Frecuencia y duración de las crisis de ausencia en grupo control sin orquiectomía, con orquiectomía adulta o con orquiectomía neonatal. A) Frecuencia.** La media de frecuencia de las crisis de ausencia aumentó de manera significativa en el grupo con orquiectomía adulta en comparación con el grupo control y con orquiectomía neonatal (ANOVA,  $F_{(1)} = 6.87$   $P < 0.05$  y  $F_{(2)} = 15.271$   $P < 0.001$ , respectivamente). **B) Duración.** La orquiectomía adulta también aumentó la duración de las crisis los periodos de 09:00 – 11:00, 21:00 – 23:00 y 03:00 - 5:00 en comparación con el grupo control (ANOVA,  $F_{(2)} = 28.95$ ,  $P < 0.001$ ). La barra blanca muestra la fase de luz y la barra negra la fase oscura del ritmo circadiano. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  entre el grupo control y el grupo con orquiectomía adulta y & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$ , &&& $P < 0.001$  entre el grupo con orquiectomía adulta y con orquiectomía neonatal.

Al comparar la media de crisis en 24 horas entre el grupo control y el grupo con orquiectomía adulta, se obtuvo que estas fueron desde  $86.14 \pm 30.42$  crisis hasta  $187.88 \pm 24.74$  crisis (ANOVA,  $F_{(1)}=6.87$ ,  $P<0.05$ ).

En cuanto a la duración de las crisis también se obtuvo un aumento significativo en el grupo con orquiectomía adulta con la duración máxima de  $2.317 \pm 0.17$  segundos a las 11:00 (ANOVA  $F_{(2)} = 8.977$ ,  $P<0.001$ ). La media de duración para el grupo control y con orquiectomía neonatal fue de  $1.77 \pm 0.03$  y de  $1.71 \pm 0.05$  segundos, respectivamente. Mientras que para el grupo con orquiectomía adulta, la duración media aumentó hasta  $2.08 \pm 0.03$  segundos (ANOVA,  $F_{(2)} = 28.95$ ,  $P<0.001$ ).

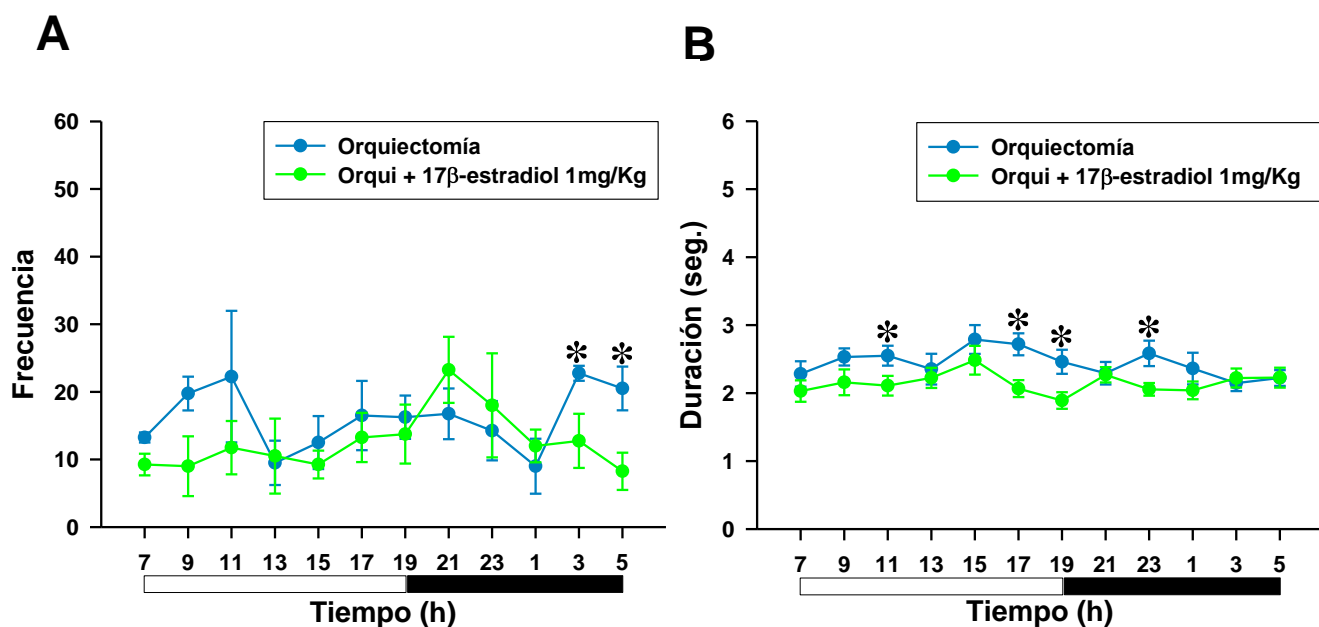
En términos de latencia no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos a pesar de que se observa una disminución de latencia a la primera crisis el grupo con orquiectomía adulta (ANOVA,  $F_{(2)}=1.04$ ,  $P<0.4$ ).



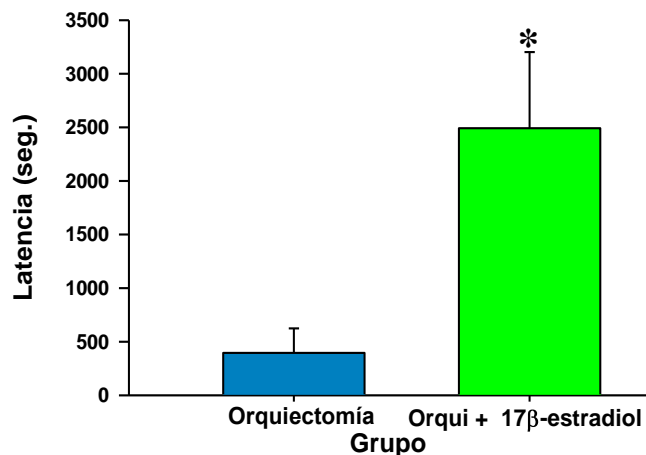
**Figura 20. Latencia para la primera crisis de ausencia.** El grupo con mayor latencia a la primera crisis fue el grupo control, seguido del grupo con orquiectomía neonatal. A pesar de que en el grupo con orquiectomía adulta se observa una disminución en la latencia a la primera crisis, esta diferencia no fue significativa entre los grupos (ANOVA,  $F_{(2)}=1.04$ ,  $P<0.4$ ).

### 6.1.1. Efecto de la administración del 17 $\beta$ -estradiol en las crisis de ausencia en ratas *taiep* con orquiectomía

Se obtuvo un aumento en las crisis de ausencia en las ratas con orquiectomía, pero sin administración de 17 $\beta$ -estradiol a las 3:00 y a las 5:00. La administración del 17 $\beta$ -estradiol disminuyó el total de crisis de ausencia un 27% en comparación con el grupo sin administración de la hormona. El grupo control mostró una media de 193.25  $\pm$  32.1 crisis de ausencia y tras la administración del 17 $\beta$ -estradiol esta frecuencia disminuyó hasta 151.0  $\pm$  21.75 crisis de ausencia, sin ser esta diferencia significativa (prueba de la *t* de Student,  $t_{(6)}=1.09$ ,  $P<0.5$ ).



**Figura 21. Frecuencia, duración y latencia en grupo con orquiectomía adulta o con orquiectomía más administración de 17 $\beta$ -estradiol 1mg/Kg. A) Frecuencia.** Se observa una disminución en la frecuencia de las crisis de ausencia tras la administración de estradiol, a pesar de que esta disminución fue significativa únicamente a las 03:00 y a las 05:00. **B) Duración.** Se observa una disminución significativa en la duración de las crisis en el grupo con administración de 17 $\beta$ -estradiol a las 11:00, en el periodo de 17:00 a 19:00 y a las 23:00. La barra blanca muestra la fase de luz y la barra negra la fase oscura del ritmo circadiano.



**Figura 22. Latencia a la aparición de la primera crisis de ausencia en segundos.** La administración de estradiol aumentó significativamente la latencia a la primera crisis desde 395.35 segundos en el grupo control hasta 2491.92 ± 710.44 segundos (\* $P < 0.05$ ).

La duración de las crisis de ausencia también disminuyó de manera significativa tras la administración de 17β-estradiol, obteniendo una media de 2.143 ± 0.046 segundos y de 2.433 ± 0.04 segundos en el grupo con estradiol y control, respectivamente (prueba de la  $t$  de Student,  $t_{(1375)} = 4.554$ ,  $P < 0.001$ ).

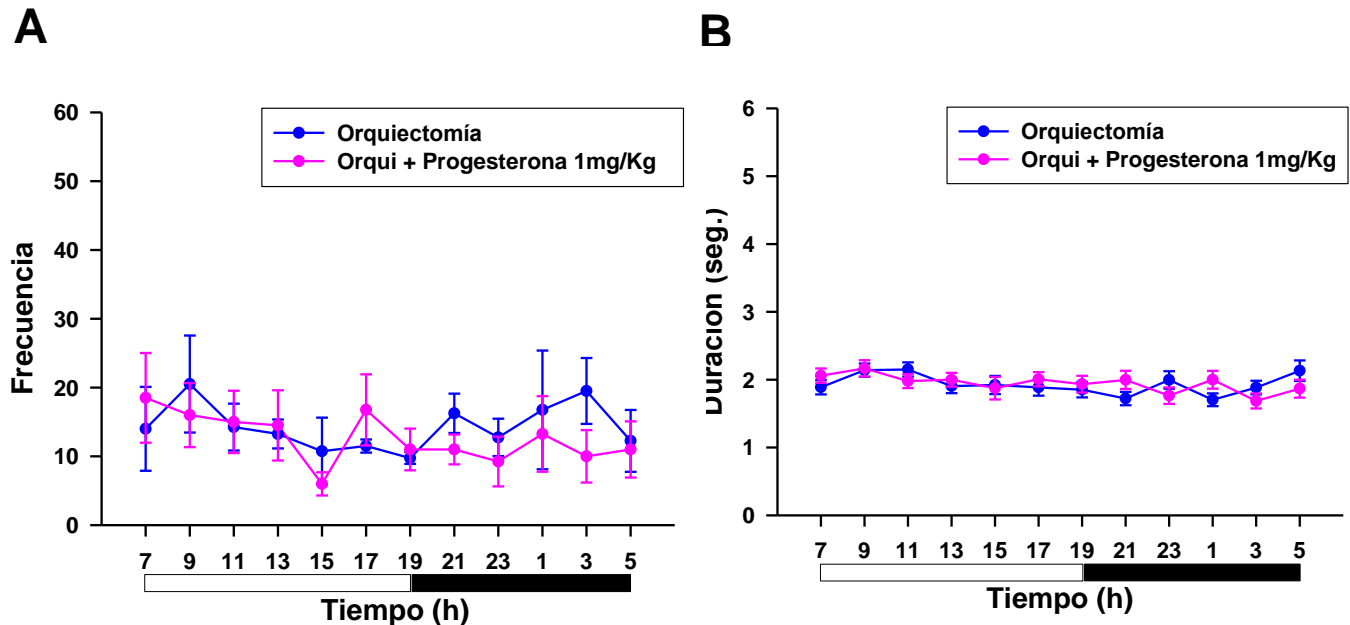
En cuanto a la latencia, ésta aumentó de manera significativa desde 395.35 ± 228.77 segundos en el grupo control hasta 2,491.92 ± 710.44 segundos tras la administración del 17β-estradiol (prueba de la  $t$  de Student,  $t_{(6)} = -2.80$ ,  $P < 0.05$ ; véase Figura 22).

### 6.1.2. Efecto de la administración de la progesterona en las crisis de ausencia en ratas *taiep* con orquiectomía

La administración de progesterona no modificó la duración o frecuencia de crisis de ausencia. La media de frecuencia en el grupo control fue de 172 ± 41.40 crisis y con administración de progesterona fue de tan solo 154 ± 32.2 crisis en un periodo de 24 horas (prueba de la  $t$  de Student,  $t_{(6)} = 0.343$ ,  $P < 0.8$ ).

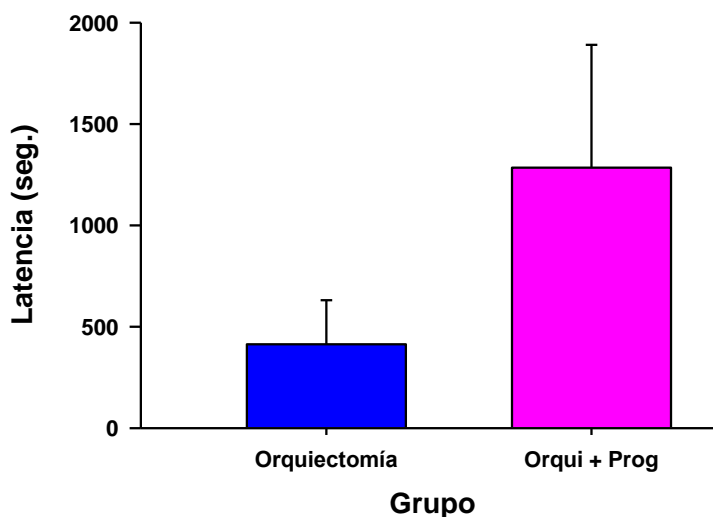


Se obtuvo una duración media muy similar con  $1.93 \pm 0.03$  segundos para el grupo control y de  $1.95 \pm 0.03$  segundos con administración de progesterona (prueba de la *t* de Student  $t_{(1302)} = -0.57, P < 0.6$ ).



**Figura 23. Frecuencia, duración y latencia en los grupos con orquiectomía adulta o con orquiectomía más administración de progesterona 1mg/Kg.** La administración de progesterona no tuvo efectos en la **A)** frecuencia de crisis de ausencia registradas cada dos horas a lo largo del ciclo circadiano o en la **B)** duración en segundos de las crisis de ausencia a lo largo de 24 horas. La barra blanca muestra la fase de luz y la barra negra la fase oscura del ritmo circadiano.

En cuanto a la latencia para la primera crisis de ausencia, tampoco se observaron diferencias significativas con la administración de progesterona a pesar de que aumentó desde  $413.47 \pm 217.41$  hasta  $1,284.72 \pm 605.62$  segundos (prueba de la *t* de Student,  $t_{(6)} = -1.35$ ; véase Figura 24).



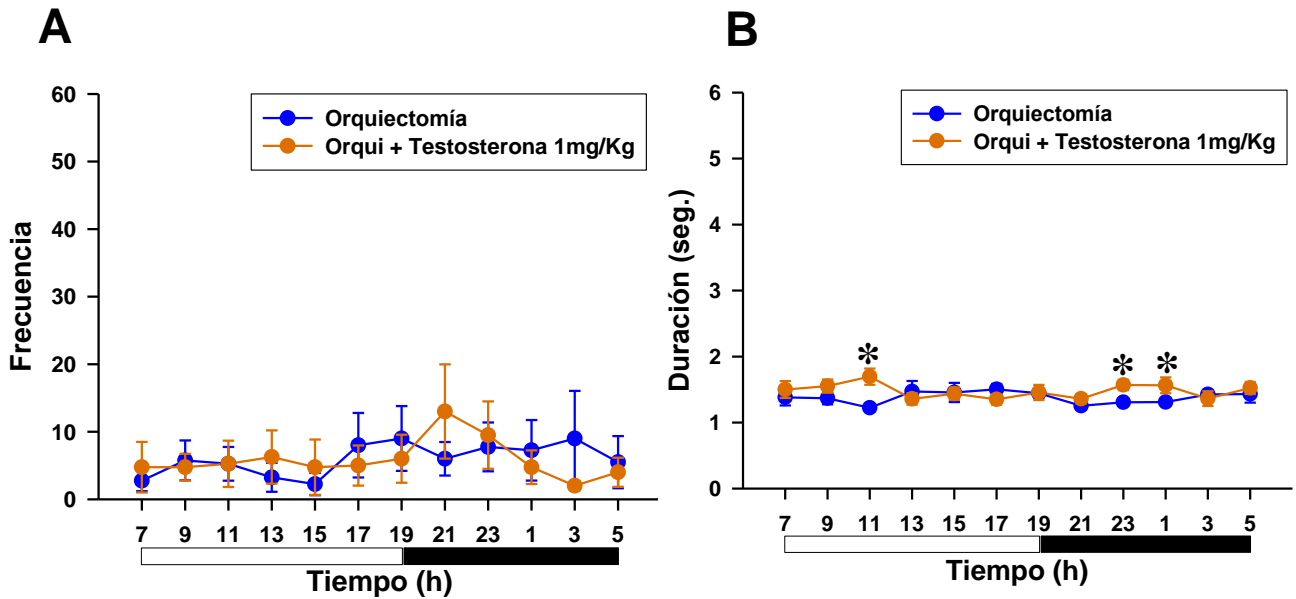
**Figura 24. Latencia para que suceda la primera crisis de ausencia.** En las ratas orquiectomizadas y con administración de progesterona se obtuvo un ligero aumento no significativo de la latencia a la primera crisis.

### 6.1.3. Efecto de la administración de la testosterona en las crisis de ausencia en ratas *taiep* con orquiectomía

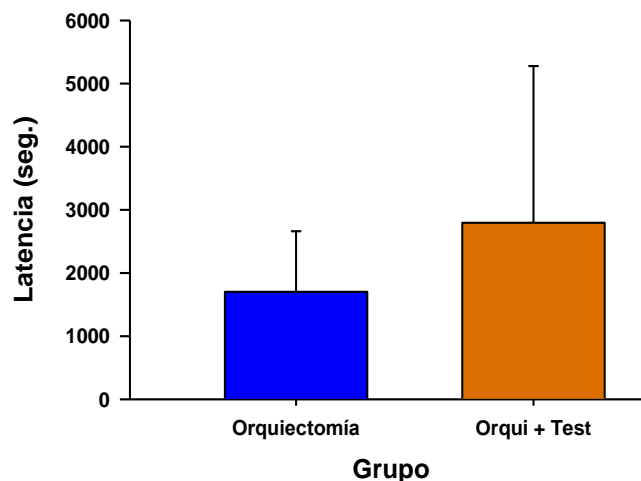
La frecuencia de las crisis de ausencia en ratas con orquiectomía pero sin administración de testosterona y después con administración de testosterona (1mg/Kg) no se obtuvieron diferencias significativas, obteniendo un total de  $73.25 \pm 36.81$  de crisis en 24 horas en el registro control y de  $70.50 \pm 33.81$  crisis en 24 horas después de la administración del andrógeno (prueba de la  $t$  de Student,  $t_{(0)}=0.055$ ).

La duración promedio en 24 horas del grupo con orquiectomía fue de  $1.37 \pm 0.02$  segundos, la cual aumentó hasta  $1.46 \pm 0.02$  segundos de manera significativa tras la administración de testosterona (prueba de la  $t$  de Student,  $t_{(3.874)}=-2.477$ ,  $P<0.05$ ). Esta diferencia se presenta en los intervalos de las 11:00, 23:00 y 01:00 (véase Figura 25).

Adicionalmente, la latencia aumentó de  $1,703.07 \pm 958.38$  segundos para el grupo con orquiectomía sin administración de hormona hasta  $2,796.80 \pm 2,481.14$  segundos para el grupo con administración de testosterona, pero este incremento no fue significativo (prueba de la  $t$  de Student  $t_{(2.979)}=-0.41$ ; véase Figura 26



**Figura 25. Frecuencia, duración y latencia a la primera crisis de ausencia en ratas con orquiectomía en la edad adulta o con orquiectomía más administración de testosterona 1mg/Kg.** La administración de testosterona no tuvo efectos sobre **A)** frecuencia de las crisis de ausencia registradas cada dos horas a lo largo del ciclo circadiano. En cuanto a la **B)** duración **media** en segundos de las crisis de ausencia, se observa un aumento significativo a las 11:00, 23:00 y 01:00 (prueba de la *t* de Student,  $t_{(41)}=-3.5$ ,  $t_{(68)}=-2.6$ ,  $t_{(46)}=-2.2$ ,  $P<0.05$ ). La barra blanca muestra la fase de luz y con la barra negra la fase oscura del ritmo circadiano (\* $P<0.05$ ).

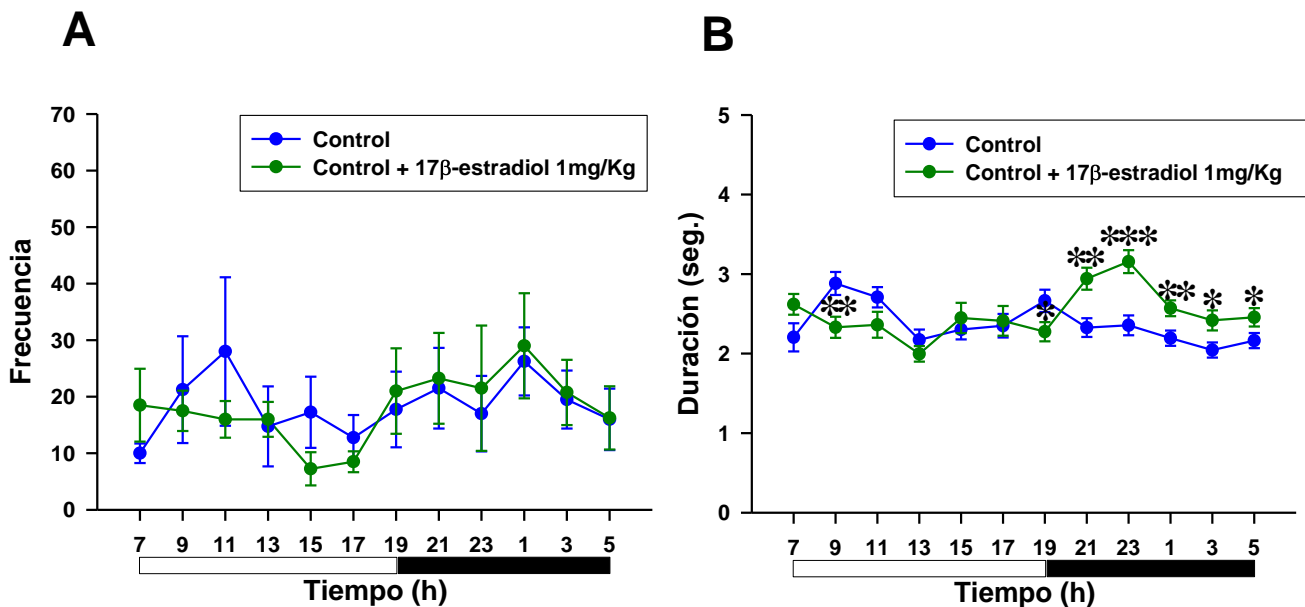


**Figura 26. Latencia a la aparición de la primera crisis de ausencia en ratas macho orquiectomizadas o con administración de testosterona.** No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la latencia en el grupo con orquiectomía y con orquiectomía más administración de la testosterona, a pesar de que se observa un ligero aumento en el grupo con administración de testosterona.

## 6.2. Grupo sin orquiectomía

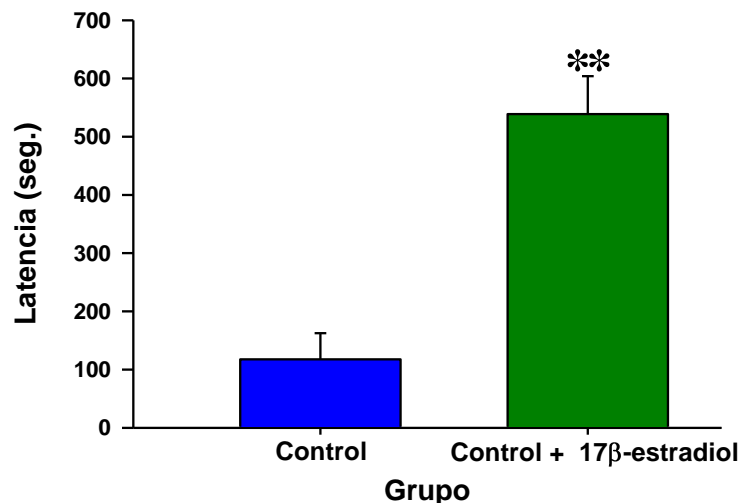
### 6.2.1. Efecto de la administración del 17 $\beta$ -estradiol en las crisis de ausencia en ratas *taiep* sin orquiectomía

Para la frecuencia de crisis de ausencia, no se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo control o tras la administración del 17 $\beta$ -estradiol 1mg/Kg. En la duración media de las crisis, a pesar de que inicialmente se obtuvo una disminución con la administración del 17 $\beta$ -estradiol a las 09:00 y 19:00, posteriormente el tiempo se incrementa a las 21:00, obteniendo una media de  $2.65 \pm 0.047$  segundos para el grupo al cual se le administró el 17 $\beta$ -estradiol y de  $2.38 \pm 0.375$  segundos para el grupo control (prueba de la *t* de Student para muestras independientes  $t_{(1556)} = -4.367$ ,  $P < 0.001$ ; véase Figura 27).



**Figura 27. Frecuencia y duración de las crisis de ausencia en los grupos sin orquiectomía y sin orquiectomía más la administración de 17 $\beta$ -estradiol 1mg/Kg. A) Frecuencia.** No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de las crisis evaluadas cada 2 horas a lo largo del ciclo circadiano. **B) Duración.** La administración de 17 $\beta$ -estradiol disminuyó las crisis en la hora 9:00 y 19:00 y posteriormente aumentó las crisis desde las 21:00 hasta las 5:00. La barra blanca muestra la fase de luz y la barra negra la fase oscura del ritmo circadiano. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

Adicionalmente, la latencia para la aparición de la primera crisis de ausencia tras la administración del  $17\beta$ -estradiol aumentó de manera significativa desde  $117.57 \pm 45.03$  segundos en el grupo control hasta  $538.82 \pm 65.08$  segundos tras la administración del  $17\beta$ -estradiol (prueba de la  $t$  de Student,  $t_{(6)} = -5.322$ ,  $P < 0.01$ ; véase figura 28).

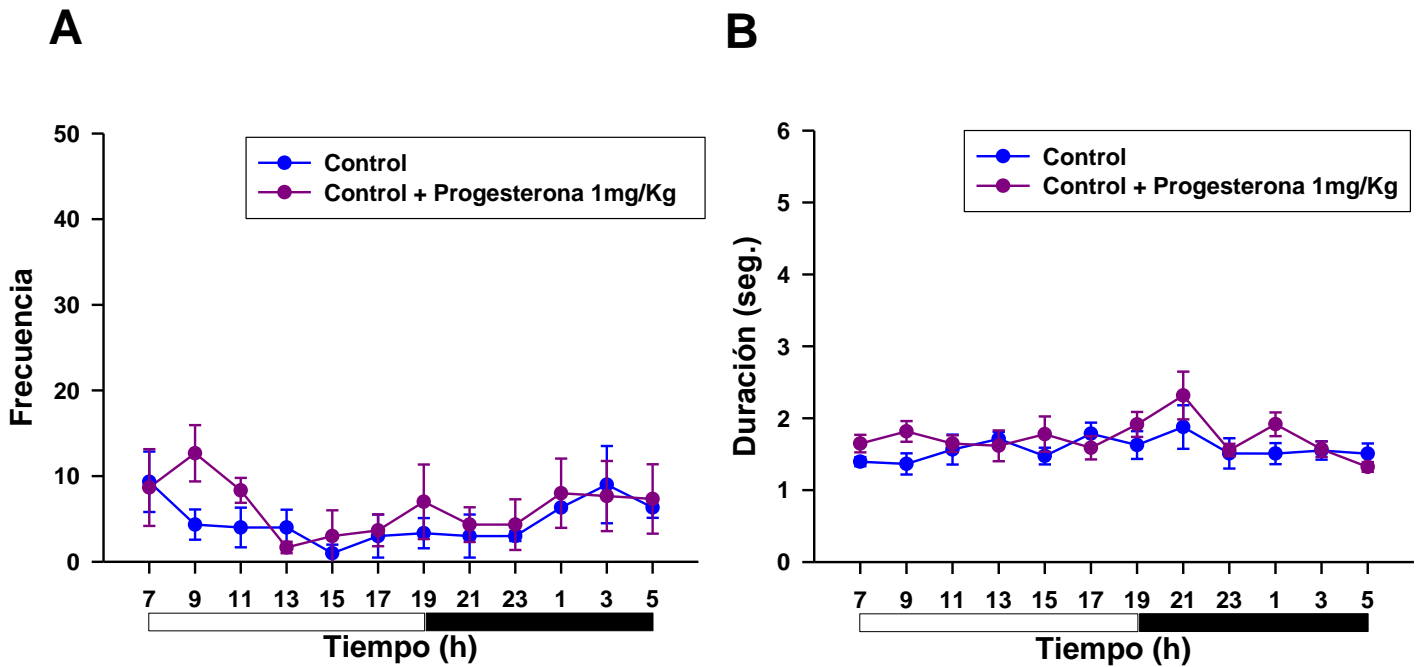


**Figura 28. Latencia para la primera crisis de ausencia.** Así como en la duración, también se obtuvo una diferencia significativa en la latencia, con un aumento de 458% en la latencia a la primera crisis de ausencia tras la administración de  $17\beta$ -estradiol (prueba de la  $t$  de Student,  $t_{(6)} = -5.322$ ,  $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.01$ ).

### 6.2.2. Efecto de la administración de la progesterona en ratas *taiep* sin orquiectomía en las crisis de ausencia

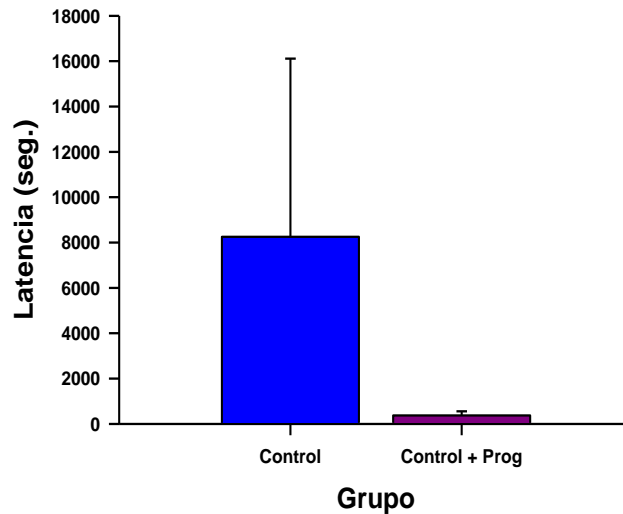
La frecuencia total de las crisis de ausencia aumentó con la administración de progesterona desde  $56.66 \pm 15.05$  crisis hasta alcanzar  $76.66 \pm 28.86$  crisis en 24 horas. Sin embargo, este aumento no fue significativo (prueba de la  $t$  de Student  $t_{(6)} = -0.61$ ,  $P \leq 0.6$ ). Esta frecuencia tampoco tuvo diferencias significativas a lo largo de las 24 horas.

En cuanto a la duración media de las crisis de ausencia por intervalo de dos horas, tampoco se obtuvieron cambios significativos, pero sí fue significativa al comparar el promedio de duración de las crisis de ausencia en 24 horas, aumentando desde  $1.54 \pm 0.04$  hasta  $1.72 \pm 0.04$  segundos después de la administración de progesterona (prueba de la  $t$  de Student,  $t_{(398)} = -2.632$ ,  $P < 0.05$ ; véase Figura 29).



**Figura 29. Frecuencia y duración de las crisis de ausencia en los grupos sin orquiectomía adulta o sin orquiectomía más administración de progesterona 1mg/Kg. A) Frecuencia.** No se obtuvieron diferencias significativas en la frecuencia de crisis de ausencia cada dos horas a lo largo del ciclo circadiano. **B) Duración.** La administración de progesterona no modificó la duración en segundos de las crisis de ausencia. La barra blanca muestra la fase de luz y la barra negra la fase oscura del ritmo circadiano.

Por otro lado, se obtuvo una disminución en la latencia desde  $8,251.00 \pm 7,860.72$  segundos a tan solo  $372.66 \pm 182.33$  segundos en el grupo sin orquiectomía y sin orquiectomía tras administración de la progesterona, respectivamente. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (prueba de la  $t$  de Student  $t_{(6)}=1.00$ ,  $P \leq 0.5$ , véase Figura 30).

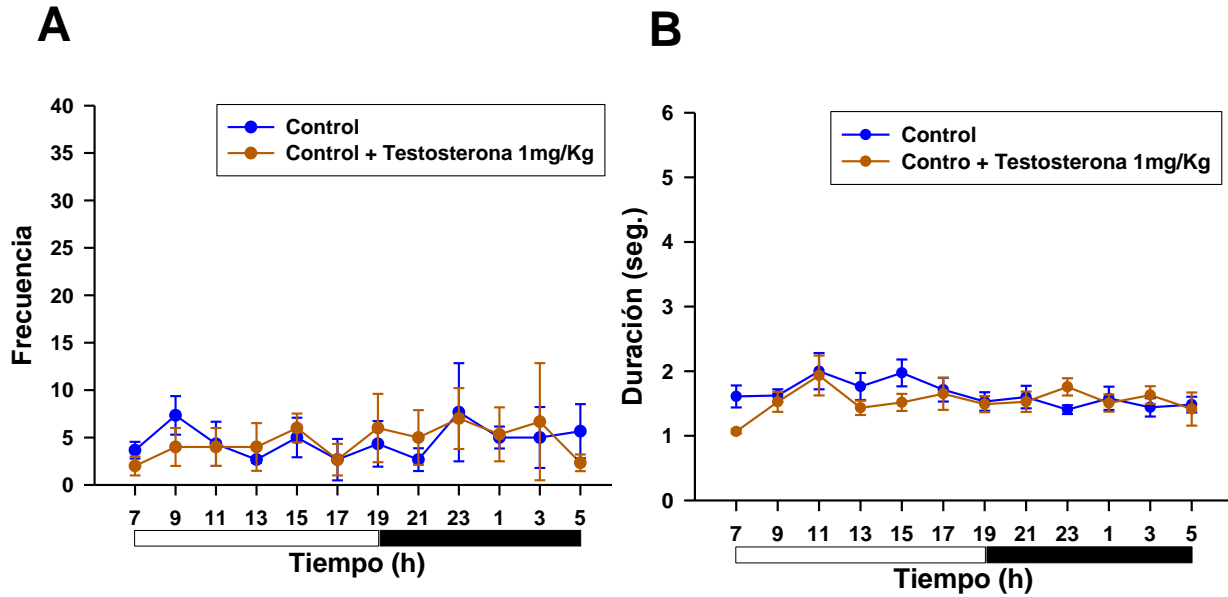


**Figura 30. Latencia a la primera crisis de ausencia.** A pesar de que se observa una disminución en la latencia en el grupo al que se le administró la progesterona, esta disminución no fue significativa (prueba de la *t* de Student,  $t_{(6)}=1.00$ ,  $P \leq 0.5$ ).

### 6.2.3. Efecto de la administración de la testosterona en ratas *taiep* sin orquiectomía en las crisis de ausencia

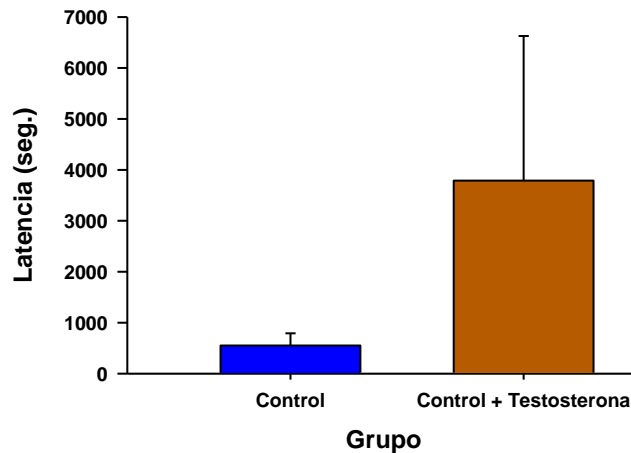
La administración de testosterona no modificó la frecuencia, duración o latencia de las crisis de ausencia en ratas intactas. En el grupo control se obtuvo una media de  $56.0 \pm 21.0$  crisis en 24 horas y en el grupo con administración de testosterona fue de  $55.33 \pm 24.60$  crisis en 24 horas (prueba de la *t* de Student  $t_{(6)}=0.021$ ,  $P < 1.0$ ).

La duración media de las crisis en el grupo control fue de  $1.62 \pm 0.04$  segundos y con la administración de testosterona disminuyó a  $1.57 \pm 0.05$  segundos, sin que fuera estadísticamente significativa (prueba de la *t* de Student  $t_{(332)}=0.630$ ,  $P < 0.6$ , véase Figura 31).



**Figura 31. Frecuencia y duración de las crisis de ausencia en los grupos sin orquiectomía adulta o sin orquiectomía más administración de testosterona 1mg/Kg. A) Frecuencia.** No se obtuvieron diferencias significativas en la frecuencia de las crisis de ausencia cada dos horas a lo largo del ciclo circadiano (prueba de la  $t$  de Student,  $t_{(6)}=0.021$ ,  $P<0.1$ ). **B) Duración.** La administración de testosterona no modificó la duración en segundos de las crisis de ausencia (prueba de la  $t$  de Student  $t_{(332)}=0.63$ ,  $P<0.6$ ). La barra blanca muestra la fase de luz y la barra negra la fase oscura del ritmo circadiano.

A pesar de que en la latencia se obtuvo un aumento tras la administración de testosterona que fue desde  $551.9 \pm 239.44$  segundos hasta alcanzar  $3,788.93 \pm 2,839.71$  segundos, esta tampoco fue estadísticamente significativa (prueba de la  $t$  de Student,  $t_{(6)}=0.319$ ,  $P<0.1$ ).



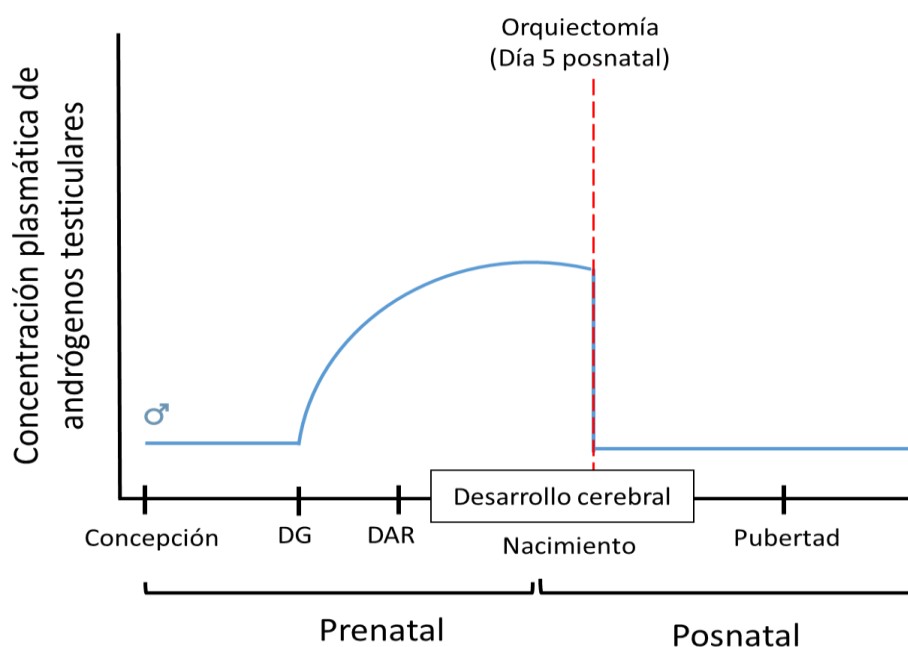
**Figura 32. Latencia para la primera crisis de ausencia.** Se observa un aumento en la latencia a la primera crisis de ausencia en el grupo al cual se le administró la testosterona, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (prueba de la  $t$  de student,  $t_{(6)}=0.31$ ,  $P<0.1$ ).



## 7. Discusión de Resultados

### 7.1. Rol de los andrógenos gonadales. Efectos de la orquiectomía adulta y neonatal

Una gran parte de los estudios que evalúan el posible rol de las hormonas sexuales sobre la epilepsia se relacionan con el papel de la progesterona o los estrógenos, principalmente debido a su relación con el ciclo estral o menstrual (Scharfman y MacLusky, 2006). De hecho, existe un tipo de epilepsia denominada catamenial que es aquella que se presenta solo en el periodo menstrual (Nariño y cols., 2005).



**Figura 33. Representación de la concentración plasmática de las hormonas esteroides sexuales en ratas macho (línea azul) tras la orquiectomía al día 5 postnatal (línea roja punteada).** Los testículos comienzan a secretar andrógenos durante el desarrollo prenatal y hasta los primeros días del periodo posnatal. Al realizar la orquiectomía al día 5 postnatal, estos efectos organizacionales que tienen lugar los primeros días de vida de la rata se ven modificados y estas modificaciones alteran la frecuencia de las crisis de ausencia en las ratas *taiep* macho. DG = desarrollo gonadal. DAR = desarrollo del aparato reproductor.

En este trabajo se presenta por primera vez el efecto diferencial de los andrógenos testiculares en la frecuencia y duración de las crisis de ausencia en un modelo animal tal como lo es el mutante de mielina *taiep*. Adicionalmente, se ha reportado un dimorfismo sexual en la frecuencia de crisis de ausencia en las ratas *taiep* ya que los machos

presentan 1,032 veces más crisis que las hembras a los tres meses, lo cual nos permitió el análisis del rol de las hormonas esteroides sexuales en la modulación de las crisis de ausencia.

Primero, se demostró que las ratas macho son más susceptibles que las ratas hembra a tener presentar crisis de ausencia (Cortés y cols., manuscrito en preparación). Además, se demostró que los efectos organizacionales de la diferenciación sexual del cerebro en los primeros días de vida de la rata afectan la frecuencia de las crisis de ausencia en la etapa adulta (véase la Figura 33).

Por el contrario, los machos orquiectomizados en la edad adulta tuvieron más crisis de ausencia y estas son de mayor duración, lo que sugiere que es la testosterona la que en el cerebro adulto macho de la rata *taiep* tiene un efecto antiausencia durante la diferenciación sexual cerebral, pero que si se retiran estos andrógenos testiculares en el día postnatal 5 se modifica la organización del cerebro y disminuyen la frecuencia de las crisis de ausencia, lo que implica un efecto dual de los andrógenos testiculares dependiendo de la edad de los sujetos. Estos resultados infieren que estos andrógenos testiculares son capaces de inducir efectos organizacionales y activacionales en diferentes circuitos del cerebro relacionados con este tipo de epilepsia. Estos hallazgos son inéditos, ya que los circuitos hormonales involucrados en la diferenciación sexual se relacionan con los cambios en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas o en los circuitos que controlan las conductas sexuales específicas, proceptivas y lordosis en las hembras, y montas, intromisión y eyaculación en los machos (Numan, 2015). De hecho, en la literatura se ha encontrado diferencias morfológicas y electrofisiológicas en el núcleo ventro-medial del hipotálamo que controlan la lordosis y donde actúan los estrógenos y la progesterona (Swaab, 2007).

En cuanto a las hormonas esteroides sexuales, se sabe que estas pueden tener una acción específica sobre la neurotransmisión cortico-talámica y que a su vez pueden ser moduladoras de la actividad epiléptica en las crisis del tipo de ausencia. Asimismo, en las crisis de ausencia existe un aumento de las subunidades  $\alpha 4$  y  $\delta$  del receptor GABA<sub>A</sub> que a su vez aumenta la inhibición en las neuronas talámicas, lo cual contribuye al aumento de las crisis de ausencia dependiente de la edad (Pisu y cols., 2008; van

Luijtelaar y cols., 2014), tal como lo hemos obtenido en las ratas *taiep* (Cortés y cols., manuscrito en preparación).

Por otra parte, se han hecho estudios en ratas *taiep* donde se muestra que los agonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, como es el gaboxadol, aumentan la frecuencia y duración de las crisis de ausencia, mientras los antagonistas como la bicuculina o el pentilinetetrazol (PTZ), disminuyen la duración de las crisis (Ibarra-Hernández, 2018). Dadas las características conductuales y electroencefalográficas se ha demostrado que las ratas *taiep* cumplen con los criterios necesarios para ser un modelo adecuado de crisis de ausencia (Pitkanen y cols., 2006).

Adicionalmente, sabe que en las crisis de ausencia existe una hiperactivación del sistema inhibitorio mediado por el receptor GABA<sub>A</sub> (Tolmacheva y van Luijtelaar, 2007). De esta manera, las hormonas esteroideas que modulan de manera positiva el receptor GABA<sub>A</sub>, como es el caso con los metabolitos de la progesterona y testosterona, aumentan el número y la duración de las crisis de ausencia en las ratas *taiep*.

## 7.2. Administración de progesterona

La hormona esteroidea más utilizada para los estudios en crisis de ausencia es la progesterona debido a su acción moduladora sobre el receptor GABA<sub>A</sub> (Grünewald y cols., 1992; Majewska y cols., 1986). La rata WAG/Rij es el principal modelo animal en el que se han estudiado los efectos de la progesterona (van Luijtelaar y cols., 2014). En ratas hembra WAG/Rij, cuando la concentración de progesterona aumenta, como ocurre durante el embarazo, la cantidad de crisis inducidas por medio de pentilinetetrazol se ve disminuida (van Luijterlaar y cols., 2009).

También se ha demostrado que la progesterona y sus metabolitos, principalmente la 3 $\alpha$ -5 $\alpha$ -tetrahidroprogesterona o alopregnanolona (Majewska y cols., 1986), actúan como moduladores positivos del receptor GABA<sub>A</sub>, aumentando la frecuencia de apertura de los canales de cloro, por lo que la administración vía sistémica de altas dosis de progesterona

aumenta la frecuencia y duración de crisis de ausencia en estudios con diferentes modelos animales de crisis de ausencia (Grünewald y cols., 1992 ; Reddy, 2004).

En el presente trabajo, la administración de progesterona no tuvo ningún efecto sobre la frecuencia, duración o latencia de las crisis de ausencia, pero usando un esquema de dosis agudas. En 2001, Edwards y cols., describieron este mismo efecto a dosis bajas de progesterona en crisis inducidas por medio de pulsos eléctricos aplicados directamente en la amígdala llamado encendido, el cual consiste en pulsos de poca corriente, corta duración y espaciados entre sí, pero al repetir estos estímulos hay un aumento progresivo en la respuesta electrográfica produciendo finalmente crisis tónico-clónicas (Racine, 1978). Esto sugiere que es necesaria una dosis mayor para inducir el efecto e incrementar la frecuencia de las crisis. Por otra parte, estudios en el Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor demuestran que la administración de progesterona en una dosis de 20 mg/Kg sí aumenta la frecuencia de las crisis de ausencia en ratas hembra *taiep* (Ramé y cols., 2019).

### 7.3. Administración del 17 $\beta$ -estradiol

El 17 $\beta$ -estradiol también tiene la capacidad de regular el sistema GABAérgico (Nakamura y cols., 2004). Sin embargo, los efectos del estradiol se han estudiado principalmente en modelos de epilepsia convulsiva o producida a través de fármacos no convulsivos como es el pentilinetetrazol (Horn y Buterbaugh, 1986a; Jana Velíšková, 2007). En cuanto a las crisis de ausencia se sabe que tiene efectos anticrisis principalmente en las crisis de ausencia atípicas inducidas por AY-944, estas crisis tienen un inicio y término menos abrupto y se dan principalmente en individuos con una función cognitiva dañada, por lo que en este tipo de crisis se obtiene el efecto contrario al que se obtienen en los modelos de crisis de ausencia típica como es la rata WAG/Rij (van Luijtelaar y cols., 2014).

En ratas hembra, se ha propuesto que la ovariectomía aumenta la transmisión GABAérgica en el cerebro, aumentando de esta manera las crisis de ausencia, así como una alteración en los niveles de expresión del receptor GABA<sub>A</sub> (Yildiz y cols., 2011). Sin embargo, estudios del grupo de van Luijtelaar y cols., en 2011 sugieren que el 17 $\beta$ -

estradiol no tiene efecto sobre las crisis de ausencia. Por otra parte, se sabe que el  $17\beta$ -estradiol induce la despolarización de las neuronas de la región CA1 del hipocampo, como parte de los efectos rápidos que tienen los estrógenos seguramente a través de sus efectos membranales (Wong y Moss, 1991).

En este trabajo se demostró que el efecto del  $17\beta$ -estradiol no es el mismo en ratas intactas que en las ratas con orquiectomía. Los andrógenos testiculares de alguna manera influyen en el efecto que tiene el estradiol en las crisis de ausencia, ya que a pesar de que se observa una disminución inicial en la duración de las crisis, esta aumenta hasta las 12 horas posteriores a la administración de la hormona (véase Figura 27). Debemos considerar a futuro administraciones crónicas como el que se logra con el implante de tubos de silastic llenos de hormonas que producen niveles de esteroides estables (Velíšková, 2007).

Adicionalmente, se demostró que el estradiol tiene un efecto modulador sobre las crisis en ratas con orquiectomía ya que disminuyó su duración, la frecuencia y aumentó la latencia a la primera crisis de ausencia. En conclusión, el  $17\beta$ -estradiol tiene un efecto protector ante las crisis de ausencia en las ratas macho *taiep* orquiectomizadas, pero no en las intactas, seguramente por interacciones en los órganos blanco de las regiones cerebrales.

#### 7.4. Administración de testosterona

Estudios sobre los efectos de la testosterona en las crisis de ausencia proponen que esta ejerce sus efectos antiepilépticos o proepilépticos a través de sus metabolitos como lo es la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona o el  $3\alpha$ -androstenediol, respectivamente (van Luijterlaar y cols., 2009). Específicamente, se sabe que el metabolito de la testosterona  $3\alpha$ -androstenediol tiene similitud estructural con la alopregnanolona que es un modulador positivo del receptor  $GABA_A$ , y que esta modulación positiva del receptor incrementa las crisis de ausencia a través del complejo enzimático de la aromatasa (Majewska y cols., 1986).

En contraste, Reddy y cols. (2004), demostraron que el  $3\alpha$ -androstenediol tiene efectos antiepilépticos en un modelo de epilepsia inducido por fármacos (Reddy, 2004). Adicionalmente, la testosterona tiene efectos proepilépticos en modelos convulsivos de epilepsia al reducir la dosis de pentilinetetrazol necesaria para inducir las crisis epilépticas en modelos de ratones y ratas, además este efecto se vio disminuido al bloquear la conversión de la testosterona en su metabolito, el  $17\beta$ -estradiol (Reddy, 2004).

La testosterona es el principal andrógeno circulante en los machos. Los resultados obtenidos después de la orquiectomía adulta indican el papel protector que tienen los andrógenos testiculares. No obstante, la administración aguda de testosterona no tuvo efectos significativos en las ratas *taiep*, tanto en el grupo sin orquiectomía, como en el grupo con orquiectomía. Esto concuerda con estudios realizados en la rata WAG/Rij en donde la administración aguda de testosterona en dosis con una dosis de 10mg/Kg hasta 30 mg/Kg, dosis suprafisiológicas, pero no tuvieron efectos antiepilépticos, sino que dos horas después de la administración cuando las crisis de ausencia aumentaron seguramente debido a cambios transcripcionales por acción genómica (van Luijterlaar y cols., 2009b).

En conclusión, las alteraciones en los niveles de testosterona pueden contribuir a un aumento en las crisis de ausencia. Sin embargo, los mecanismos por los cuales ocurren estos efectos no se tienen aún claros. Lo que sí se sabe es que aquellos esteroides que modulen de manera positiva el receptor  $GABA_A$ , tienen efectos proepilépticos en los modelos de crisis de ausencia lo que concuerda con las evidencias clínicas en donde se ha mostrado que las drogas de naturaleza  $GABA$ érgica están contraindicadas como tratamiento para este tipo de epilepsia generalizada (Beyenburg y cols., 2004; Parker y cols., 2008).

Los esteroides sexuales son capaces de modular la frecuencia, duración y latencia de las crisis de ausencia. Este efecto se observó principalmente tras la administración de  $17\beta$ -estradiol. En cuanto a la progesterona y la testosterona, son necesarias dosis más altas para observar su papel en la modulación de las crisis de ausencia en ratas *taiep* o bien, su administración crónica.

Si los andrógenos testiculares disminuyen al día 5 posnatal se obtuvo una disminución en la frecuencia y latencia de las crisis de ausencia en la edad adulta. Por lo que concluimos que existe una modificación en la organización del cerebro de la rata macho al remover los testículos en una etapa temprana y esto es un resultado relevante ya que se ha reportado que en más del 90% de los casos, estas crisis de ausencia disminuyen con la pubertad, que es cuando se activa el eje hipotálamo-hipófisis-gónada y el cual está asociado al incremento de los niveles de esteroides gonadales (Posner, 2008).

Nuestros resultados muestran el papel dual de los andrógenos gonadales dependientes de la edad de los sujetos (véase Figura 19), lo que proporciona una base para un análisis a nivel de ensambles de neuronas, de sus propiedades celulares y moleculares que sean las responsables de los cambios en las crisis de ausencia.

## 8. Conclusiones

1. Los andrógenos testiculares actúan como moduladores antiausencia en la etapa adulta de la rata macho *taiep*.
2. Si los andrógenos testiculares son eliminados en la etapa temprana de la rata macho, la frecuencia de crisis de ausencia disminuye en la etapa adulta.
3. Las hormonas esteroides sexuales, principalmente el  $17\beta$ -estradiol modulan la frecuencia de las crisis de ausencia en la rata macho *taiep*.

## Bibliografía

- Abou-khalil, B.W., Gallagher, M.J., Macdonald, R.L., (2016). Epilepsies. En: *Bradley's Neurology in Clinical Practice*. 7a edición por Darrof, R.B., Jankovic, K., Mazziotta J.C., y Pomeroy S.L. Elsevier, Londres. 1563–1614.
- Alexandra Rotstein. (2011). Sex hormone synthesis, regulation, and function. *Endocr Rev.* **1**, 81–151.
- Arain, F.M., Boyd, K.L., Gallagher, M.J. (2012). Decreased viability and absence-like epilepsy in mice lacking or deficient in the GABAA receptor  $\alpha 1$  subunit. *Epilepsia* **53**, 161–165.
- Avoli, M. (2012) . A brief history on the oscillating roles of thalamus and cortex in absence seizures. *Epilepsia* **53**, 779–789.
- Bennett, T.L., Krein, L.K., (1989). *The neuropsychology of epilepsy*, 1a edición. ed. Springer, Boston, MA.
- Beyenburg, S., Bauer, J., Reuber, M., (2004). New drugs for the treatment of epilepsy: A practical approach. *Postgrad. Med. J.* **80**, 581–587.
- Bonnasco, C., Fuenzalida, M., Couve, E., (2008). The *taiep* rat: a neurological mutant as a model to understand the role of glial cells in synaptoc transmission. *Recent Adv. Res. Updat.* **9**, 449–460.
- Bormann, J., (2000). The “ABC” of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 16–19.
- Buterbaugh, G.G., (1989). Estradiol replacement facilitates the acquisition of seizures kindled from the anterior neocortex in female rats. *Epilepsy Res.* **4**, 207–215.
- Coenen, A.M.L., Van Luijtelaa, E.L.J.M., (1987). The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: age and sex factors. *Epilepsy Res.* **1**, 297–301.
- Coenen, A.M.L., Van Luijtelaa, E.L.J.M., (2003). Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav. Genet.* **33**, 635–655.
- Cortés, M.D.C., Gavito, B., Ita, M.L., Valencia, J., Eguibar, J.R., (2005). Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on *taiep* rats. *Synapse* **58**, 95–101.



- Cortés Sánchez, M. del C., Fierro Rojas, A., (2018). Género y trastornos afectivos. En: Blazquez Graf, N., Chapa Romero, A.C. (Eds.), *Inclusión Del Análisis de Género En La Ciencia*. p. 188.
- Cortez, M., Cunnane, S., Snead, O.C., (2002). Brain sterols in the AY-9944 rat model of atypical absence seizures. *Epilepsia* **43**, 3–8.
- Dorantes-Álvarez, L.M., Medina-Bravo, P., (2005). Ernest Starling y el nacimiento de la Endocrinología, *Boletín médico del Hospital Infantil de México. AMERBAC*.
- Ebert, M.H., Chengappa, K.N.R., (1998). The biochemical basis of neuropharmacology. *J. Clin. Psychiatry* **59**, 258.
- Edwards, H.E., Mo, V., Burnham, W.M., MacLusky, N.J., (2001). Gonadectomy unmasks an inhibitory effect of progesterone on amygdala kindling in male rats. *Brain Res.* **889**, 260–263.
- Eguibar, J.R., Cortés, M. del C., (2010a). Modelos de crisis de ausencia en roedores. *Gac. Med. Mex.* **146**, 332–338.
- Eguibar, J.R., Cortés, M. del C., (2010b). El mutante de mielina taiep como un modelo de crisis de ausencia. *Gac. Med. Mex.* **146**, 11–18.
- Falco-Walter, J.J., Scheffer, I.E., Fisher, R.S., (2018). The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res.* **139**, 73–79.
- Festing, M.F.W., (1979). Inbred Strains in Biomedical Research **19**, 499–500.
- Fisher, R.S., Cross, J.H., D'Souza, C., French, J.A., Haut, S.R., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I.E., Schulze-Bonhage, A., Somerville, E., Sperling, M., Yacubian, E.M., Zuberi, S.M., (2017). Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia* **58**, 531–542.
- Fisher, R.S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J., (2005). Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* **46**, 470–472.
- Fuenzalida, M., Aliaga, E., Olivares, V., Roncagliolo, M., Bonansco, C., (2009). Developmental increase of asynchronous glutamate release from hippocampal synapses in mutant Taiep rat. *Synapse* **63**, 502–509.

- Gee, K.W., Chang, W.-C., Brinton, R.E., McEwen, B.S., (1987). GABA-dependent modulation of the Cl<sup>-</sup> ionophore by steroids in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **136**, 419–423.
- Greenspan, F.S., (2012). *Endocrinología básica y clínica*, 9a edición. ed. McGraw-Hill, México.
- Grünewald, R.A., Aliberti, V., Panayiotopoulos, C.P., (1992). Exacerbation of typical absence seizures by progesterone. *Seizure Eur. J. Epilepsy* **1**, 137–138.
- Herzog, A.G., Fowler, K.M., (2005). Sexual hormones and epilepsy: threat and opportunities. *Curr. Opin. Neurol.* **18**, 167–72.
- Herzog, A.G., Seibel, M.M., Schomer, D.L., Vaitukaitis, J.L., Geschwind, N., (1986). Reproductive endocrine disorders in women with partial seizures of temporal lobe origin. *Arch. Neurol.* **43**, 341–346.
- Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Riboni, L., Vega-SaenzdeMiera, E.C., (1989). Sprague Dawley rat mutant with tremor, ataxia, tonic immobility episodes, epilepsy and paralysis. *Lab. Anim. Sci.* **39**, 226–228.
- Horn, A.C., Buterbaugh, G.G., (1986). Estrogen alters the acquisition of seizures kindled by repeated amygdala stimulation or pentylenetetrazol administration in ovariectomized female rats. *Epilepsia* **27**, 103–108.
- Ibarra-Hernández, J.M., (2018). Participación del sistema GABAérgico en las crisis de ausencia en ratas taiep macho adultas. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 1–85.
- Jameson, J.L., DeGroot, L.J., De Kretser, D.M. David M., (2010). *Endocrinology: adult and pediatric*. 1a edición. Saunders/Elsevier.
- Jameson, J.L., Harrison, T.R., (2013). *Harrison's endocrinology*. 1a edición. McGraw-Hill Medical.
- Jando, G., Carpi, D., Kandel, A., Urioste, R., Horvath, Z., Pierre, E., Vadi, D., Vadasz, C., Buzsa, G., (1995). Spike-and-wave epilepsy in rats: Sex differences and inheritance of physiological traits. *Neuroscience* **64**, 301–317.
- Jarre, G., Altwegg-Boussac, T., Williams, M.S., Studer, F., Chipaux, M., David, O., Charpier, S., Depaulis, A., Mahon, S., Guillemain, I., (2017). Building up absence seizures in the somatosensory cortex: From network to cellular epileptogenic processes. *Cereb. Cortex* **27**, 4607–4623.

- King, T.L., Brucker, M.C., (2011). *Pharmacology for women's health*. Jones and Bartlett Publishers.
- Kovács, Z., Dobolyi, Á., Juhász, G., Kékesi, K.A., (2014). Lipopolysaccharide induced increase in seizure activity in two animal models of absence epilepsy WAG / Rij and GAERS rats and Long Evans rats. *Brain Res. Bull.* **104**, 7–18.
- Leavitt, W.W., Chen, T.J., Allen, T.C., O'Neal Johnston, J., (1977). Regulation of progesterone receptor formation by estrogen action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **286**, 210–225.
- Liljelund, P., Handforth, A., Homanics, G.E., Olsen, R.W., (2005). GABAA receptor  $\beta 3$  subunit gene-deficient heterozygous mice show parent-of-origin and gender-related differences in  $\beta 3$  subunit levels, EEG, and behavior. *Dev. Brain Res.* **157**, 150–161.
- Liu, K.A., Dipietro Mager, N.A., (2016). Women's involvement in clinical trials: Historical perspective and future implications. *Pharm. Pract. (Granada)*. **14**, 1–9.
- Macphee, G.J.A., Larkin, J.G., Butler, E., Beastall, G.H., Brodie, M.J., (1988). Circulating Hormones and Pituitary Responsiveness in Young Epileptic Men Receiving Long-Term Antiepileptic Medication. *Epilepsia* **29**, 468–475.
- Maggi, A., Perez, E., (1984). Progesterone and estrogens in rat brain: modulation of GABA (Gamma-Aminobutyric Acid) receptor activity. *Eur. J. Pharmacol.* **103**, 165–168.
- Majewska, M., Harrison, N., Schwartz, R., Barker, J., Paul, S., (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*. **232**, 1004–1007.
- Malafosse, A., (1994). *Idiopathic generalized epilepsies: clinical, experimental and genetic aspects*. 1a edición. John Libbey Eurotex. Guilford, Reino Unido.
- Marescaux, C., Vergnes, M., (1995). Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg (GAERS). *Ital. J. Neurol. Sci.* **16**, 113–118.
- Marescaux, C., Vergnes, M., Depaulis, A., (1992). Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *J. Neural Transm. Suppl.* **35**, 37–69.
- Martín-López, M., Francisco, J., (2009). Papel de las subunidades alfa del receptor GABA A en la regulación de la conducta agresiva. *Psiquiatría Biológica*. **14**, 167-174.
- Matejovska, I., Veliskova, J., Velisek, L., (1998). Bicuculline-induced rhythmic EEG

- episodes: gender differences and the effects of ethosuximide and baclofen treatment. *Epilepsia* **39**, 1243–1252.
- McEwen, B.S., (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 141–147.
- McEwen, B.S., Alves, S.E., (1999). Estrogen actions in the central nervous system **20**, 279–307.
- Meeren, H., van Luijterlaar, G., Lopes, F., Coenen, A., (2005). Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures. *Arch. Neurol.* **62**, 371-376.
- Melcangi, R.C., Panzica, G.C., (2006). Neuroactive steroids: Old players in a new game. *Neuroscience* **138**, 733–739.
- Möller, J.R., Durr, P.G., Quarles, R.H., Duncan, I.D., (2002). Biochemical analysis of myelin proteins in a novel neurological mutant: the *taiep* rat. *J. Neurochem.* **69**, 773–779.
- Nakamura, N.H., Rosell, D.R., Akama, K.T., McEwen, B.S., (2004). Estrogen and ovariectomy regulate mRNA and protein of glutamic acid decarboxylases and cation-chloride cotransporters in the adult rat hippocampus. *Neuroendocrinology.* **80**, 308–323.
- Nariño, D., Grillo, M.C. (2005). Epilepsia catamenial. *Acta Neurol Colomb* **21**, 25–33.
- Norman, A.W., Mizwicki, M.T., Norman, D.P.G., (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat. Rev.* **3**, 27–41.
- Nugent, B.M., Wright, C.L., Shetty, A.C., Hodes, G.E., Lenz, K.M., Mahurkar, A., Russo, S.J., Devine, S.E., McCarthy, M.M., (2015). Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat. Neurosci.* **18**, 690–697.
- Numan, M., (2015). *Neurobiology of social behavior*. Sexual behaviors and sexual differentiation. 1a edición. ed. Elsevier, San Diego, Estados Unidos de América.
- O'Connor, L.T., Goetz, B.D., Couve, E., Song, J., Duncan, I.D., (2000). Intracellular distribution of myelin protein gene products is altered in oligodendrocytes of the *taiep* rat. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 396–407.
- Ogino, Y., Sato, T., Iguchi, T., (2016). Gonadal steroids. En: *Handbook of Hormones*. 1a edición por Takei, Y., Ando, H., y Kazuyoshi, T. Elsevier,. 504–506.

- Parker, A.P.J., Agathonikou, A., Robinson, R., Panayiotopoulos, C, (2008). Inappropriate use of carbamazepine and vigabatrin in typical absence seizures. *Dev. Med. Child Neurol.* **40**, 517–519.
- Pennell, P.B., (2009). Hormonal aspects of epilepsy. *Neurol. Clin.* **27**, 941–65.
- Penry, K., (1981). Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures: from the commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia.* **22**, 489–501.
- Persad, V., Cortez, M.A., Snead, O.C., (2002). A chronic model of atypical absence seizures: Studies of developmental and gender sensitivity. *Epilepsy Res.* **48**, 111–119.
- Pisu, M.G., Mostallino, M.C., Dore, R., Mura, M.L., Maciocco, E., Russo, E., De Sarro, G., Serra, M., (2008). Neuroactive steroids and GABAA receptor plasticity in the brain of the WAG/Rij rat, a model of absence epilepsy. *J. Neurochem.* **106**, 2502–2514.
- Pitkanen, A., Schwartzkroin, P., Moshe, S., (2006). *Models of Seizures and Epilepsy*, 2a edición. ed, Models of Seizures and Epilepsy. Elsevier Inc., Londres.
- Posner, E., 2008. Absence seizures in children. *BMJ Clin. Evid.* **12**. 1-15.
- Racine, R., 1978. Kindling: the first decade. *Neurosurgery.* **3**. 234-252.
- Ramé, N. (2019). Efecto de la progesterona en la epilepsia de tipo crisis de ausencia en la rata *taiep*. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Reddy, D. S., (2004). Testosterone modulation of seizure susceptibility is mediated by neurosteroids  $3\alpha$ -androstenediol and  $17\beta$ -estradiol. *Neuroscience* **129**, 195–207.
- Reddy, Doodipala S, (2004). Anticonvulsant activity of the testosterone-derived neurosteroid  $3\alpha$ -androstenediol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* **270**. 1223 - 1229.
- Scharfman, H.E., MacLusky, N.J., (2006). The influence of gonadal hormones on neuronal excitability, seizures, and epilepsy in the female. *Epilepsia* **47**, 1423–1440.
- Schwartz-Giblin, S., Korotzer, A., Pfaff, D.W., (1989). Steroid hormone effects on picrotoxin-induced seizures in female and male rats. *Brain Res.* **476**, 240–247.
- Secretaría de Salud, (2016). Epilepsia, enfermedad que afecta a dos millones de personas en México. Secretaría de Salud. Gobierno. Recuperado el 6 de febrero de

2019, de: <https://www.gob.mx/salud/prensa/epilepsia-enfermedad-que-afecta-a-dos-millones-de-personas-en-mexico-61670?idiom=es>.

- Segovia, S., Guillamón, A., Del Cerro, M.C.R., Ortega, E., Pérez-Laso, C., Rodríguez-Zafra, M., Beyer, C., (1999). The development of brain sex differences: A multisignaling process. *Behav. Brain Res.* **105**, 69–80.
- Simpson, E.R., Clyne, C., Speed, C., Rubin, G., Bulun, S., (2001). Tissue-specific estrogen biosynthesis and metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **949**, 58–67.
- Swaab, D.F., (2007). Sexual differentiation of the brain and behavior. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 431–444.
- Swann, J.W., Al-Noori, S., Jiang, M., Lee, C.L., (2000). Spine loss and other dendritic abnormalities in epilepsy. *Hippocampus* **10**, 617–625.
- Tolmacheva, E.A., van Luijtelaaar, G., (2007). Absence seizures are reduced by the enhancement of GABA-ergic inhibition in the hippocampus in WAG/Rij rats. *Neurosci. Lett.* **416**, 17–21.
- Toran-Allerand, C.D., (2004). Minireview: a plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology* **145**, 1069–1074.
- van Luijtelaaar, E., Dirksen, R., Vree, T., van Haaren, F., (1996). Effects of acute and chronic cocaine administration on EEG and behaviour in intact and castrated male and intact and ovariectomized female rats. *Brain Res.* **40**, 43-50.
- Van Luijtelaaar, G., Budziszewska, B., Jaworska-Feil, L., Ellis, J., Coenen, A., Lasoń, W., (2001). The ovarian hormones and absence epilepsy: A long-term EEG study and pharmacological effects in a genetic absence epilepsy model. *Epilepsy Res.* **46**, 225–239.
- van Luijtelaaar, G., Onat, F.Y., Gallagher, M.J., (2014). Animal models of absence epilepsies: What do they model and do sex and sex hormones matter? *Neurobiol. Dis.* **72**, 167–179.
- van Luijterlaar, G., Budziszewska, B., Tolmacheva, E.A., (2009). Hormones and absence epilepsy. En: Schwartzkroin, P. (Ed.), *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research*. Elsevier Academic Press, pp. 488–495.
- Velíšková, J., (2006). The role of estrogens in seizures and epilepsy: The bad guys or the good guys? *Neuroscience.* **138**, 837–844.

- Velíšková, J., (2007). Estrogens and epilepsy: Why are we so excited? *Neuroscientist*. **13**, 77–88.
- Vergnes, M., Marescaux, C., Micheletti, G., Reis, J., Depaulis, A., Rumbach, L., Warter, J.M., (1982). Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: A model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neurosci. Lett.* **33**, 97–101.
- Watters, J.J., Campbell, J.S., Cunningham, M.J., Krebs, E.G., Dorsa, D.M., (1997). Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* **138**, 4030–4033.
- Wong, M., Moss, R.L., (1991). Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 beta-estradiol, on CA1 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *Brain Res.* **543**, 148–52.
- Yildiz, O.K., Yildiz, C., Durmus, N., Gulturk, S., Benek, S., Cetin, A., (2011). Ovariectomy enhances spike-wave discharges in WAG/Rij rats. *Neurol. Psychiatry Brain Res.* **17**, 67–70.