



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

LABORATORIO DE NEUROFISIOLÓGÍA DE LA CONDUCTA Y CONTROL MOTOR

**EFFECTO DE LA PROGESTERONA EN LA EPILEPSIA DE TIPO CRISIS DE AUSENCIA
EN LA RATA *TAIEP***

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA:

RAME ANDRADE NAGIB

DIRECTOR DE TÉSIS

CORTÉS SANCHEZ MA. DEL CARMEN

CODIRECTOR

JOSÉ RAMÓN EGUIBAR CUENCA

ABRIL 2022



Contenido

AGRADECIMIENTOS	1
DEDICATORIA	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
EPILEPSIA.	6
CLASIFICACIÓN DE LA EPILEPSIA	7
TIPO DE CRISIS.....	7
TIPOS DE EPILEPSIA	10
HIPÓTESIS:	29
JUSTIFICACIÓN:	29
OBJETIVO GENERAL:.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	30
METODOLOGÍA:	30
ANIMALES	30
IMPLANTE DE ELECTRODOS.....	30
TRATAMIENTO POSTCIRUGÍA	32
HABITUACIÓN PRE-REGISTRO.....	32
OVARIECTOMÍA	33

HISTERECTOMÍA	34
ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS Y REGISTRO	34
PROCOLO EXPERIMENTAL.....	35
GRUPO 1:	36
GRUPO 2:	36
RECOLECCIÓN DE DATOS Y ESTADÍSTICA:.....	37
RESULTADOS	39
RESULTADOS DEL GRUPO 1 CON OVARIECTOMÍA (OVX):.....	40
RESULTADOS DEL GRUPO 2 CON HISTERECTOMÍA (HTX):.....	43
DISCUSIÓN.....	46
PERSPECTIVAS	51
CONCLUSIÓN.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	53

Agradecimientos

Me gustaría dedicar este espacio para agradecer la ayuda que muchas personas y colegas me han prestado durante el proceso de investigación y redacción de este trabajo. En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres y abuelos por su apoyo y cariño incondicional, a mi directora de tesis, la Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez y al Dr. José Ramón Eguibar Cuenca quienes con su experiencia, apoyo y constante motivación y paciencia me inspiraron a ser una mejor persona e investigador.

Así mismo, deseo expresar mi agradecimiento a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a mis profesores por apoyarme en mi formación académica. A toda mi familia, mis amigos, compañeros de laboratorio y futuros colegas que siempre me ayudaron de una manera atenta y desinteresada durante este largo y cansado proceso les agradezco de todo corazón.

Agradezco al CONACyT, por los proyectos con No. 243,333 y 243,247 a favor de MCCS y JRE, respectivamente y a la VIEP-BUAP por el apoyo del proyecto otorgado al cuerpo académico BUAP–CA-288 por financiar el proyecto presentado en este trabajo de tesis.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres y abuelos por demostrarme siempre su amor y apoyo incondicional en cada etapa de este proceso, espero que este trabajo los llene de orgullo tanto como a mí. A mis amigos, por su compañía y apoyo sin importar nuestras diferencias de opiniones. A los doctores por ayudarme, guiarme y presionarme para dar siempre lo mejor de mí en todo lo que haga. Y, por último, a mis compañeros de laboratorio por ofrecerme su apoyo y consejo cuando lo necesité y por todas esas tardes de estudio y comida que siempre recordaré con mucho cariño.

Resumen

La epilepsia es el tercer trastorno neurológico más común en el mundo y afecta de manera diferencial a hombres y mujeres. Se ha demostrado que durante el embarazo la elevación persistente de la progesterona produce un incremento en la frecuencia y duración en las crisis epilépticas del tipo de las crisis de ausencia. Recientemente, se ha mostrado en modelos animales que las hormonas involucradas en el ciclo estral tienen componentes neuroactivos que modifican la excitabilidad neuronal. La rata *taiep* cuyo nombre es el acrónimo de: temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis, es un mutante de la mielina que presenta descargas tipo espiga-onda, características de la epilepsia generalizada del tipo de las crisis de ausencia, que son un tipo de epilepsia no convulsiva. La rata *taiep* es el único modelo disponible de la leucodistrofía humana denominada hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y el cerebelo (H-ABC).

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la progesterona en las crisis de ausencia en la rata *taiep* hembra adulta evaluando la frecuencia, la duración y la latencia de las crisis de ausencia en ratas de un grupo control respecto de aquellas que recibieron progesterona administrada por vía subcutánea a una dosis de 20 mg/Kg en un volumen de aceite de oliva constante de 0.2 mL/Kg.

Nuestros resultados muestran que la progesterona tuvo efectos significativos sobre la frecuencia y la latencia de las crisis de ausencia en el mutante de mielina *taiep* en ratas hembra ovariectomizadas e histerectomizadas, pero no en las ratas hembra que solo fueron ovariectomizadas. Esto implica que la biodisponibilidad de

la hormona es un factor relevante para valorar sus efectos sobre las crisis de ausencia en este modelo de hipomielinización-desmielinización que es homóloga a la leucodistrofia denominada hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y cerebelo (H-ABC). Esto es relevante ya que es frecuente que las alteraciones de la mielina, ya sean congénitos o adquiridos, se asocian a crisis de tipo epiléptico.

En conclusión, nuestros resultados muestran que los efectos de la progesterona dependen de la condición neuroendócrina de los sujetos y este es un hecho que debe ser considerado cuando se exploran los efectos de los esteroides sexuales ya sea en machos o en las hembras.

Introducción

Epilepsia.

Una “crisis” es una alteración paroxismal de la función neurológica causada por la descarga excesiva e hipsincrónica de las neuronas en el cerebro (International League Against Epilepsy (ILAE), 2017). El término “*crisis epiléptica*” se usa para diferenciar una crisis causada por un evento de actividad eléctrica anormal en el cerebro a una causada por un evento no-epiléptico, tales como las crisis psicógenas. La epilepsia es una condición caracterizada por crisis que son recurrentes y no provocadas (Shorvon y cols., 2011). Una crisis provocada por un evento reversible, por ejemplo: debido a fiebre o hipoglucemia no caen en la definición de epilepsia porque es una condición secundaria resultado de un evento en particular, no derivada de una condición crónica (Shorvon y cols., 2011). Por otra parte, el síndrome epiléptico se refiere a un grupo de características clínicas que normalmente ocurren juntas, con tipos similares de crisis, edad de inicio, resultados de los estudios electroencefalográficos, genética y respuesta a drogas antiepilépticas (Shorvon y cols., 2011).

La epilepsia puede aparecer a cualquier edad, muchas personas desarrollan la condición en la infancia, y otros tienen su primera crisis hasta la tercera edad. Normalmente, no existen síntomas físicos entre cada crisis, pero el miedo de que ocurran afecta en la vida privada y laboral de los pacientes que padecen esta condición incluso la vida de sus familiares (ILAE, 2017).

Los tratamientos antiepilépticos pueden ayudar a prevenir las crisis y a mantener una buena calidad de vida. Por desgracia, debido a la diversa etiología de la condición, los tratamientos no siempre son efectivos y 3 de cada 10 pacientes bajo tratamiento continúan con crisis de manera regular. Esto hace a la epilepsia una de las condiciones más complicadas de tratar y para el paciente que la padece es especialmente difícil vivir una vida social y laboral normal (ILAE, 2017).

La epilepsia es una de las condiciones neurológicas más comunes del mundo, la proporción de la población general con epilepsia activa (es decir, con ataques continuos o necesidad de tratamiento) en un momento dado se estima entre 4 y 10 personas cada 1000 (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2022). Alrededor de 1% de la población mundial padece de esta condición y casi un tercio de estos pacientes no cuentan con una terapia o tratamiento antiepiléptico eficaz que los ayude a prevenir las crisis (ILAE, 2017).

Clasificación de la Epilepsia

La más reciente clasificación de crisis y epilepsias fue publicada en el 2017 por la ILAE (de las siglas en inglés de International League Against Epilepsy) y es una clasificación en tres niveles, diseñada para ajustarse a diferentes ambientes clínicos alrededor del mundo.

Tipo de Crisis

El primer punto de esta clasificación es determinar el tipo de crisis, para este nivel se asume que el médico ya ha hecho un diagnóstico definitivo de que se trata de una crisis epiléptica, debido a que, esta clasificación no es válida para diagnosticar o diferenciar entre las crisis epilépticas, de las no epilépticas.

Las crisis se pueden clasificar en las que son de inicio local, inicio generalizado e inicio desconocido. Las crisis focales se originan en redes neuronales limitadas a parte de un hemisferio cerebral a diferencia de las crisis generalizadas que comienzan en redes neuronales distribuidas bilateralmente (Shorvon y cols. 2011). Una crisis puede comenzar focalmente y después expandirse de manera generalizada y pueden originarse en la corteza cerebral o en estructuras subcorticales y mediante registros electroencefalográficos (EEG) categorizar el tipo de crisis.

Los subtipos principales de crisis generalizadas son las crisis tónico-clónicas generalizadas (GTC), mioclónicas, atónicas y las crisis de ausencia. Las crisis tónico-clónicas generalizadas consisten en movimientos convulsivos simétricos y bilaterales de todos los miembros con una pérdida de la conciencia. Las crisis mioclónicas consisten en súbitos y breves movimientos que no están asociados con alguna perturbación clara de la conciencia (Shorvon y cols., 2011). Estas contracciones musculares breves e involuntarias pueden afectar uno o varios músculos; por lo tanto, las crisis mioclónicas pueden ser generalizadas o focales. Las crisis atónicas involucran la pérdida del tono muscular, a menudo resultando

que el paciente deje caer la cabeza por la pérdida del tono en los músculos del cuello (Shorvon y cols., 2011).

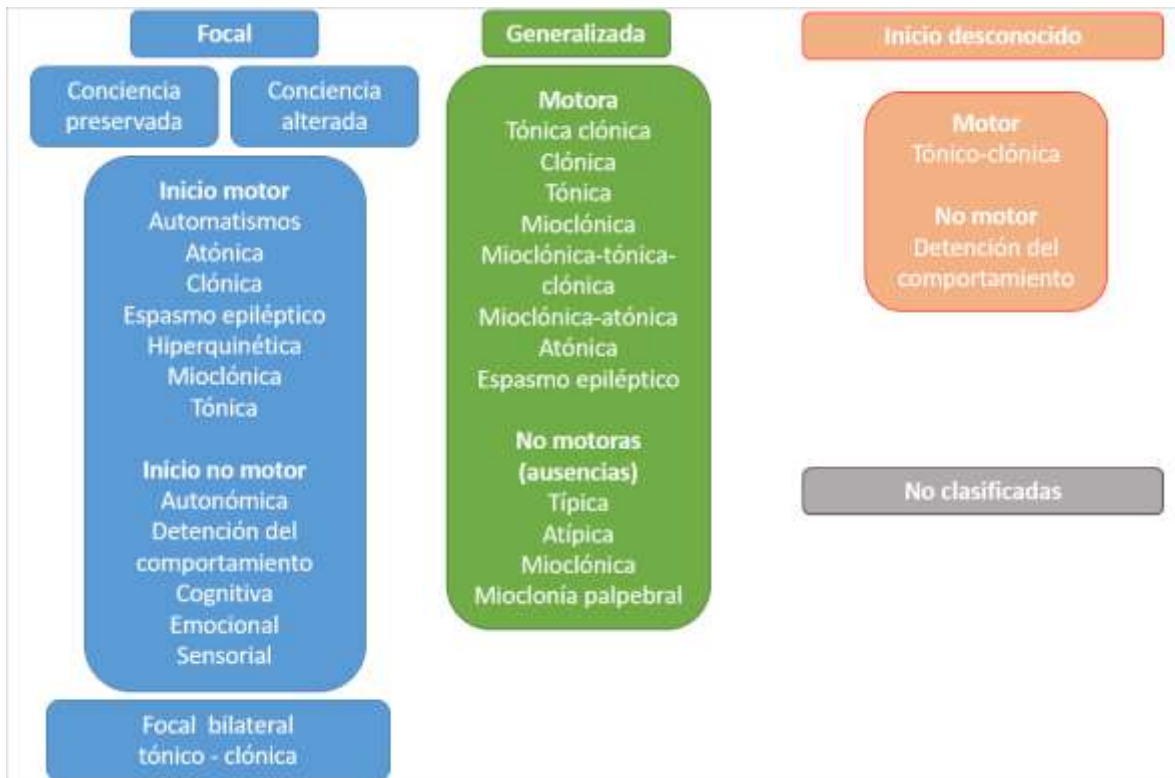


Figura 1. Esquema en dónde se muestran los tipos de crisis epilépticas con base a su expresión electroencefalográfica de acuerdo a la ILAE (2017).

Las manifestaciones clínicas de las crisis focales dependen del área que se vea afectada. Por ejemplo, una crisis focal que se origina en el lóbulo occipital puede presentarse como un fenómeno de alucinaciones visuales para el paciente; en circunvolución precentral, con actividad motora; y en la circunvolución post-central con síntomas sensoriales tales como parestesias, entumecimiento o bien hormigueo

en una o varias partes del cuerpo. Cuando se ve afectada la conciencia durante una crisis focal, la crisis se clasifica como “*discognitiva*”, denominado antes como “*complejo parcial*”. Las crisis provenientes del lóbulo temporal son con regularidad discognitivas. Algunas crisis están precedidas por un “*aura*”, la cual es una crisis focalizada donde el paciente pierde la conciencia y describe síntomas motores, sensoriales o autonómicos. Un aura precede a las crisis focales o generalizadas por segundos o incluso minutos y son más comunes en pacientes que presentan epilepsia del lóbulo temporal (Shorvon y cols. 2011).

Tipos de epilepsia

Las epilepsias fueron previamente clasificadas de acuerdo con su sitio de inicio generalizado o relacionado a una ubicación específica en la corteza cerebral o por su etiología, si la causa es conocida se denomina sintomática o no conocida a las que se les denomina idiopáticas.

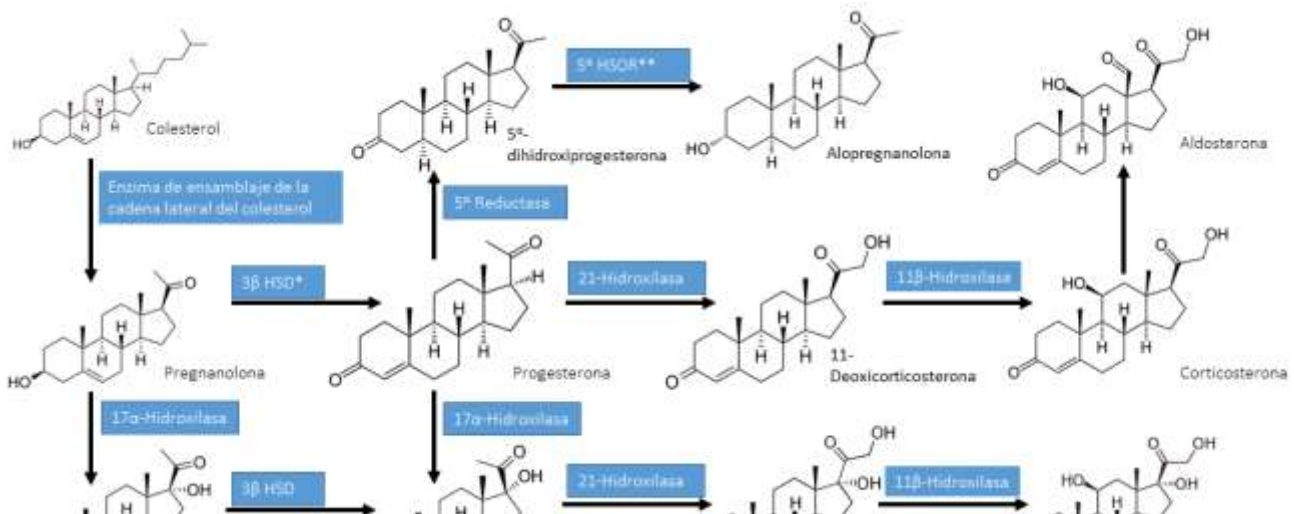
Las crisis de ausencia son un tipo de epilepsia no convulsiva, caracterizada por episodios breves y recurrentes de inconciencia a menudo acompañados por automatismos simples o componentes clónicos, atónicos o autonómicos. Hay dos tipos de crisis de ausencia: las típicas y las atípicas. Las crisis de ausencia típicas suelen ocurrir en niños con un desarrollo e inteligencia normales. Duran aproximadamente 10 segundos y pueden mostrarse en el electroencefalograma por unas descargas simétricas y regulares de tipo espiga-onda con una frecuencia principal de 2.5 a 4 Hz, que son las señales patognomónicas para el diagnóstico de

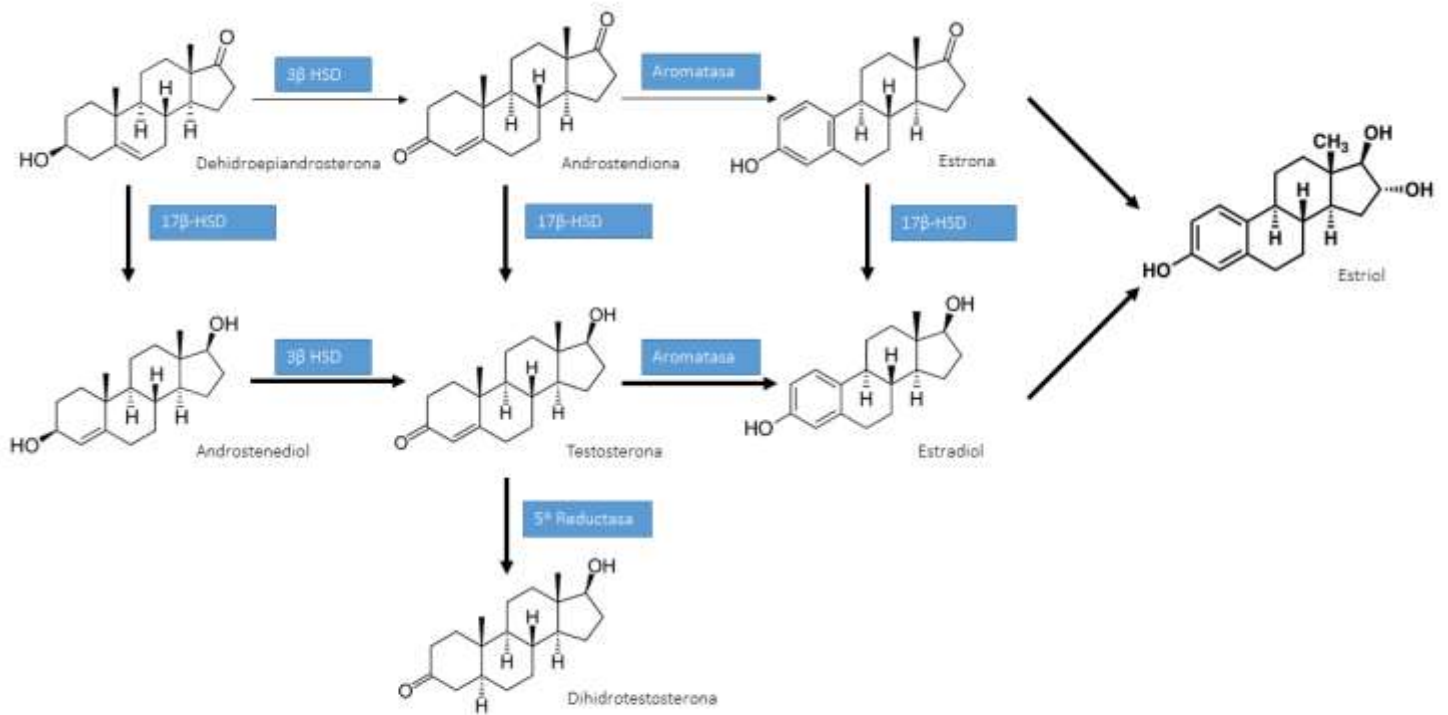
esta condición. Si no se tratan, las crisis pueden tener un impacto significativo sobre el bienestar físico del infante, así como su capacidad de aprender y disminuir la calidad de vida. La mayor parte de las crisis de ausencia típicas responden adecuadamente al tratamiento con medicamentos anticonvulsivos tales como el valproato de sodio, la etosuximida o lamotrigina y normalmente desaparecen durante la adolescencia en dos tercios de los casos (ILAE, 2017).

Durante los últimos años, el fácil acceso a un número de modelos animales de crisis de ausencia generalizada y a sofisticadas técnicas electrofisiológicas que permiten la investigación de las redes talámicas y corticales han ayudado a nuestro entendimiento de la patogénesis de esta condición. El mecanismo básico subyacente aparenta involucrar un circuito tálamo-cortical y la generación de ritmos oscilatorios anormales en esa red neuronal en particular. Los mecanismos bioquímicos dentro del circuito tálamo-cortical durante esta oscilación neuronal parecen vincular la inhibición mediada por ácido gamma aminobutírico (GABA) con la excitación mediada por glutamato (Shorvon y cols. 2011). El mecanismo celular básico que actúa sobre esta tensión entre la excitación y la inhibición parece involucrar una corriente de calcio tipo T (Steriade y cols., 1993). Los circuitos locales dentro del tálamo tienen influencia sobre los ritmos oscilatorios de la inhibición mediada por receptores del tipo GABA-A. Los diferentes factores que afectan estas redes neuronales pueden causar un ritmo neuronal oscilatorio anormal dentro del circuito tálamo-cortical, lo que produce una descarga bilateral sincrónica con morfología espiga-onda que son características de las crisis de ausencia (Taubøll, 1993).

Mientras la patogénesis de las crisis de ausencia ha sido dilucidada en modelos animales con crisis de ausencia, el rol de los factores endócrinos tales como las hormonas esteroideas no están completamente claro. La progesterona ha sido considerada un antiepiléptico por mucho tiempo, sin embargo, a diferencia de las crisis convulsivas, estos neuroesteroides agravan las condiciones epilépticas de las crisis de ausencia debido a que actúan modulando los receptores del subtipo GABA-A (Taubøll, 1993).

Los neuroesteroides son moduladores de la neurotransmisión, sobre todo la neurotransmisión mediada por el neurotransmisor GABA, el cual sirve como uno de los principales sistemas de neurotransmisión inhibitoria del sistema nervioso central. Estos esteroides neuroactivos son capaces de modular la excitabilidad del cerebro en las vías inhibitorias sinápticas y tónicas reguladas por los receptores GABA-A. Los neuroesteroides tales como 3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-one (3 α -5 α -THP) también denominada alopregnanolona, son sintetizados endógenamente a partir de la progesterona, y sirve como un modulador alostérico de los receptores GABA-A (véase Figura 2; Taubøll, 1993).





*: Hidroxiesteroide Deshidrogenasa

** : 3α-hidroxiesteroide Oxidoreductasa

Figura 2. Esteroidogénesis en diferentes glándulas endócrinas. Se muestran las principales hormonas derivadas del colesterol, sus estructuras y las enzimas involucradas en su conversión, por ejemplo, 17β -HSD y 3β –HSD. Modificado de Dewick, P. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2da ed.; Wiley&Sons: West Sussex, England, 2001; p 244.

La progesterona está reconocida como un anticonvulsivo, sin embargo, su mecanismo de acción en el sistema nervioso central sólo ha sido parcialmente estudiado. Los receptores de progesterona provienen de una familia de factores de transcripción nucleares que consisten en dos isoformas: tipo A y tipo B. Estas isoformas son abundantes en el tejido cerebral, las cuales regulan la expresión de las enzimas sintetizadoras de neurotransmisores y sus receptores. Éstos están ampliamente distribuidos en el cerebro (Reddy, 2013), y la progesterona circulante en sangre pasa a través de la barrera hematoencefálica de manera relativamente ilimitada a todas las partes del sistema nervioso (McEwen, 1972; Morrell, 1975). Además, el tejido neural y la pituitaria contienen la enzima 5α reductasa, la cual es capaz de convertir la progesterona en 3α - 5α -THP dentro del cerebro (Majewska, 1985). La producción de este poderoso neuroesteroide puede, a su vez, estar presente en muchas regiones del cerebro. Estudios demostraron una participación crucial de los receptores nucleares para la progesterona en el desarrollo y la persistencia de epileptogénesis experimental. De esta manera, se ha reportado que los ratones carentes de estas isoformas son más resistentes a desarrollar cuadros epilépticos hipocampales y amigdalinas respecto de los ratones silvestres (Majewska, 1986).

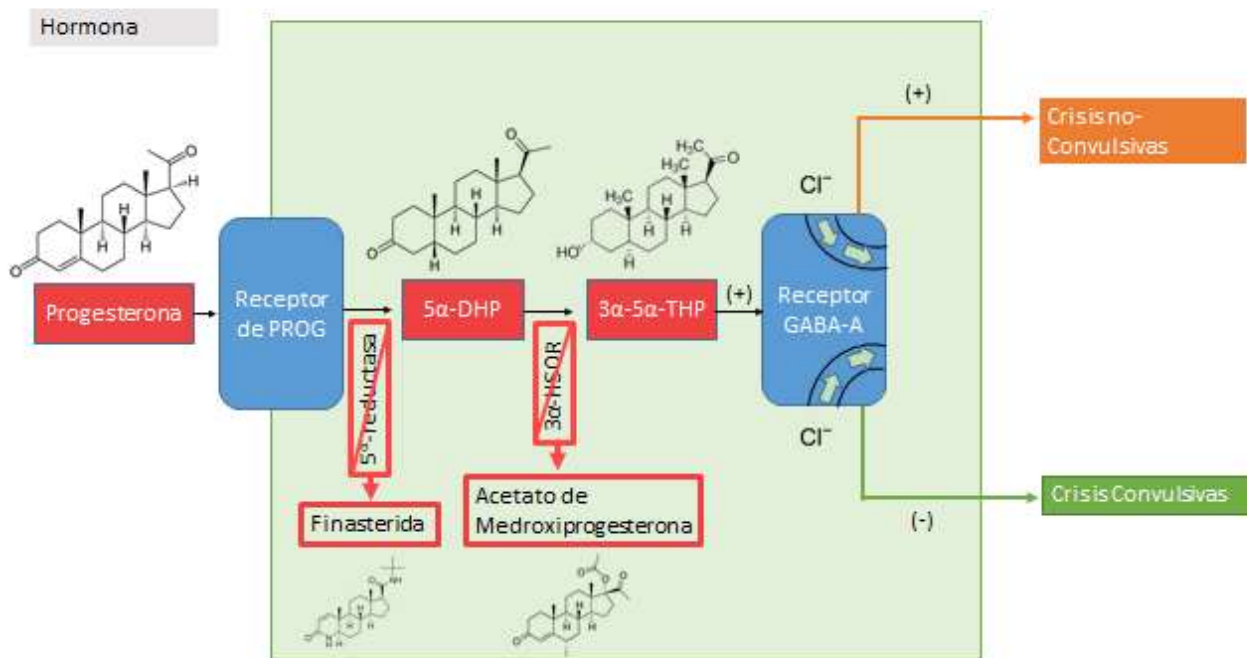


Figura 3. Metabolismo de la progesterona en el cerebro y en otros órganos. Se muestran las enzimas involucradas en la reducción de la progesterona hacia su metabolito alopregnanolona (3α-5α-THP), así como los fármacos utilizados para detener el metabolismo de la hormona en diferentes etapas de su proceso de bioconversión. Modificado de Mensah-Nyagan : "Neurosteroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system.", 1999; p.51.

El principal efecto de la 3α-5α-THP está relacionado con una potenciación del efecto GABAérgico postsináptico. La 3α-5α-THP incrementa la corriente entrante de cloro inducida por el GABA, ya que incrementa la unión de muscimol a su receptor, estimula la unión de benzodiazepina, y separa la unión de t-butilbiciclofosfonato (TBPS) en el complejo del receptor GABA. Lo que produce un incremento del efecto inhibitorio de la neurotransmisión GABAérgica. Este incremento en la inhibición GABAérgica causa exacerbación de las crisis de ausencia. Los efectos de 3α-5α-THP en la inhibición

GABAérgica fueron mostrados ampliamente por Majewska y cols., en 1986, quienes mostraron que este metabolito incrementaba tanto la amplitud como la duración de la corriente de cloro inducida por el GABA (Majewska, 1986). De esta manera, se estudió el efecto tanto de la progesterona, como de su metabolito, en la inhibición GABAérgica recurrente en rebanadas de hipocampo de la rata adulta.

Con respecto al efecto de la corriente entrante de cloro, se ha mostrado que está relacionado con el tiempo de apertura de estos canales, tal y como ocurre con los barbitúricos (Barker, 1989). A pesar de que éste podría ser su mecanismo más importante, estudios posteriores también demostraron un efecto claro sobre la frecuencia de apertura del canal. Adicionalmente, de estos efectos GABAérgicos postsinápticos, los cuales parecen ser los más relevantes, existe una discusión acerca de un posible efecto adicional a nivel presináptico (Barker, 1989). Esto sería un efecto parecido a la que producen los barbitúricos en el mismo sistema, los cuales también actúan tanto en la inhibición postsináptica como en la presináptica (Taubøll , 1993). En un estudio de la transmisión monosináptica excitatoria de la médula espinal, la liberación de transmisores del tipo de aminoácidos excitadores, los cuales se ven reducidos en presencia de barbitúricos con una ligera disminución en las ráfagas de los potenciales de acción lo que soporta un efecto presináptico (Taubøll, 1993).

Adicionalmente, al efecto en las respuestas GABAérgicas, la progesterona y sus metabolitos también actúan sobre los mecanismos sinápticos excitatorios (Smith, 1989). En una serie de estudios utilizando células de Purkinje en el cerebelo de ratas, se mostró que la progesterona y sus metabolitos reducían la capacidad de respuesta al

glutamato después de una aplicación sistémica o tópica de este esteroide. También, estos metabolitos actúan en el receptor N-metil D-Aspartato (NMDA), así como en la excitabilidad neuronal (Smith, 1989).

Es relevante que la epilepsia generalizada con las crisis de ausencia se remonta hasta el siglo XVIII (Poupart, 1705; Tissot, 1783). Sin embargo, la historia moderna de la electrofisiología de las descargas de tipo espiga-onda empezó con la publicación de Hans Berger (1933) de un registro EEG obtenido de un paciente durante una crisis. A pesar de que esta muestra mostraba un ritmo de 3 Hz sin espigas y no daba ninguna información acerca de la naturaleza generalizada del patrón electroencefalográfico, el comportamiento rítmico de alto voltaje de las descargas era evidente. Berger (1934) creía que las crisis epilépticas eran causadas por una suspensión repentina de las influencias tónico-inhedoras ejercidas por el tálamo sobre la corteza cerebral. Su perspectiva, a pesar de no estar basada en datos o experimentos, propuso que existía un rol de la corteza y el tálamo en el mecanismo de la generación de la epilepsia generalizada. Dos años después, Gibbs y cols., (1935) dieron por primera vez una evidencia de las características electroencefalográficas de las descargas de espiga-onda asociadas con las crisis de ausencia.

Contraria a las ideas de Gibbs, los doctores Penfield y Jasper propusieron una vista localizada introduciendo el concepto del sistema centroencefálico y de las denominadas crisis centroencefálicas (Penfield y Jasper, 1947, 1954; Penfield, 1952). La propuesta de Jasper para definir en ese tiempo organización anatómica y funcional del

sistema tálamo-cortical como una unidad integradora de diversas funciones fisiológicas (Jasper, 1949).

En los años 60's del siglo XX, algunos estudios trataron de refutar la hipótesis centroencefálica en terrenos experimentales. Marcus y Watson (1966, 1968) fueron capaces de inducir descargas de tipo espiga-onda en el EEG aplicando bilateralmente fármacos convulsivos en la corteza frontal de gatos y primates; esta actividad EEG fue asociada en animales despiertos con las crisis de ausencia. Adicionalmente estos autores descubrieron que la sincronía bilateral de las descargas espiga-onda en este modelo eran interrumpidas por la sección del cuerpo calloso, y que dos áreas largas homólogas, una en cada hemisferio, podían generar descargas espiga-onda. Demostrando que el tronco encefálico y el tálamo no eran un prerrequisito necesario para la aparición de las crisis de ausencia (Berger, 1934).

Argumentos a favor de un origen cortical de la epilepsia generalizada primaria también surgieron de los estudios realizados por Robert Naquet en los babuinos senegaleses *Papio papio*; este primate presenta una predisposición epiléptica genética caracterizada por descargas espiga-onda generalizadas en respuesta a estímulos fóticos. Con ayuda de registros EEG corticales, encontraron en estos animales que las descargas bilaterales sincrónicas de espiga-onda aparecían primero en la corteza cerebral fronto-rolándica y después de eso se esparcen a otras estructuras corticales y subcorticales (Fischer-Williams y cols., 1968). Adicionalmente, estudiando las respuestas corticales provocadas por estimulación fotónica, Menini y cols., (1970) reportaron que la corteza Rolándica en estos primates fotosensibles era sumamente excitable. Estudios subsecuentes

demonstraron que la sección del cuerpo calloso causaba que la actividad epiléptica perdiera sus características sincrónica y bilateral (Naquet y cols., 1972), apoyando las pruebas de los experimentos de Marcus y Watson (1966, 1968). Por lo que en los años 60's del siglo pasado se acumuló evidencia experimental importante del rol de la corteza cerebral en las descargas espiga-onda generalizadas.

Hace más de 40 años, Pierre Gloor (1968, 1969) propuso el término “*epilepsias corticoreticulares generalizadas*” para agrupar a los pacientes que exhibían descargas espiga-onda generalizadas en el EEG. Estas entidades clínicas incluían las “*epilepsias centroencefálicas*” y las condiciones epilépticas generalizadas asociadas con descargas espiga-onda atípicas lentas en pacientes con daño cerebral. Gloor propuso que “*las descargas bilaterales sincrónicas paroximales de la epilepsia centroencefálica representan una oscilación anormal en una red neuronal corticoreticular, que puede ser resultado de una retroalimentación de control negativa normal, regulando la interacción cortical y subcortical*”. Se volvió entonces imperativo la búsqueda de un modelo experimental en el cual se pudiera probar éste nuevo concepto. El modelo seleccionado fue el gato con epilepsia generalizada inducida por penicilina (FGPE), como fue descrito por Prince y Farrell (1969). Las descargas de espiga-onda en éste modelo tienen las siguientes características: (1) se presentaban después de una aplicación intramuscular aguda de penicilina, (2) están asociados con una clara disminución de la conducta responsiva similar a las crisis de ausencia humanas y (3) cuando se registraban crónicamente, existía una reducción en la frecuencia de las crisis después de la administración de drogas efectivas en pacientes con crisis de ausencia como son el valproato y la etosuximida (Gloor y cols., 1990; Kostopoulos, 2000). La hipótesis

corticoreticular probada en el modelo FGPE se basaba en la presunción y la subsecuente demostración de que circuitos tálamo-corticales similares deben operar durante los husos de sueño y en las descargas espiga-onda en el estado de vigilia.

Los experimentos realizados en el modelo FGPE (Gloor y cols., 1990; Kostopoulos, 2000) demostraron que: (1) la depresión transitoria funcional de la actividad talámica causada por una microinyección local de K^+ CLORO eliminaba los husos de sueño y las descargas espiga-onda; (2) la remoción quirúrgica de la neocorteza interrumpía la ocurrencia de las descargas espiga-onda en el tálamo; (3) la reducción de la excitabilidad cortical por una depresión generalizada reemplaza las descargas espiga-onda en el cerebro del gato tanto en el tálamo como en la neocorteza por husos; (4) conexiones callosas e intracorticales son fundamentales para la propagación y la generación de la actividad espiga-onda (Gloor y cols., 1990). Sumando a esto, cuando las descargas de espiga-onda se desarrollaron gradualmente en husos de sueño seguido a la aplicación sistémica de penicilina, su frecuencia dio un salto a más de la mitad de la de los husos, sugiriendo que la actividad espiga-onda puede resultar de la respuesta neocortical potenciada por impulsos talámicos con una activación subsecuente de la retroalimentación intracortical inhibitoria que anuló una de cada dos ondas de huso de sueño. De acuerdo con estos hallazgos, los registros unitarios extracelulares revelaron que el pico del complejo espiga-onda está asociado con un marcado incremento en la probabilidad de disparo en el tálamo y en la neocorteza, mientras que, en las ondas, la probabilidad de disparo es virtualmente reducida a cero.

Adicionalmente, los registros intracelulares de las neuronas corticales demostraron que las descargas espiga-onda en el modelo FGPE fueron reflejadas por despolarizaciones, descargas de potencial de acción con las espigas que son mediadas por el ion cloro (Fisher y Prince, 1977; Giaretta y cols., 1987). En resumen, estos hallazgos experimentales indicaron que la integridad funcional y anatómica del tálamo y la corteza cerebral es requerida para la ocurrencia de las descargas espiga-onda y aún más específico, que la actividad que las redes talámicas representa un mecanismo “*sine qua non*” para la ritmogénesis de las descargas de espiga-onda, mientras que la hiperexcitabilidad cortical es un prerrequisito para que se generen las descargas espiga-onda.

Durante los años 90's del siglo pasado, hubo un enorme interés en la comunidad científica de la epilepsia cuando fueron descubiertos modelos genéticos animales de crisis de ausencia. En particular existen dos modelos en la rata albina Noruega (*Rattus norvegicus*) de laboratorio los cuales han sido utilizados para comprender la fisiopatología de las crisis de ausencia: la rata con crisis de ausencia genética de Estrasburgo, Francia (GAERS por sus siglas en inglés; Vergnes y cols., 1982); y la rata Wistar Albino Glaxo/Rijswijk de los Países Bajos (WAG/Rij de sus siglas en inglés; van Luijtelaar y Coenen, 1986). Ambos grupos de rata presentan descargas de espiga-onda generalizadas con perfiles farmacológicos que responden a etosuximida asemejando a las crisis de ausencia en humanos. Los primeros trabajos realizados en estos modelos confirmaron muchos de los datos obtenidos en los gatos administrados con penicilina en la corteza cerebral, incluyendo la presencia de actividad rítmica en las regiones conectadas sinápticamente con el tálamo y la neocorteza durante las descargas

espiga-onda. Estos estudios demuestran también que los ganglios basales pueden modular las descargas espiga-onda en ambos modelos (van Luijtelaaar, 1986).

El descubrimiento de que son las neuronas talámicas con canales de calcio tipo T de la corteza hacia el tálamo las que causan ráfagas de potenciales de acción una vez que la célula talámica se hiperpolariza; mostró que los circuitos tálamo-cortico-talámicos estaban organizados de tal manera que las neuronas que tienen ácido gama-aminobutírico (GABA) eran excitadas por estímulos provenientes de la corteza y células tálamo-corticales de relevo. Como resultado, las células tálamo-corticales de relevo generan potenciales postsinápticos hiperpolarizantes inhibitorios (PPHI) mediados por receptores GABA A- y GABA B- que inactivan la corriente de calcio tipo T, de este modo produciendo descargas de potencial de acción una vez que la membrana llega a niveles menos polarizados. Estas descargas de potencial de acción estimulan a las neuronas en la corteza cerebral y el núcleo reticular comenzando otro ciclo de oscilación, lo que produce una actividad rítmica oscilatoria similar a la presentada durante husos de sueño que caracterizan al sueño de ondas lentas (Steriade y cols., 1993). Por lo tanto, el núcleo reticular talámico está dotado de mecanismos que proveen a la ritmogénesis particular de los husos de sueño y, quizás, de las descargas espiga-onda de las crisis de ausencia; este aspecto fue estudiado a detalle por Avanzini y cols., (1993) en las ratas GAERS.

Estudios publicados en los años 90s del siglo pasado han demostrado que una función talámica alterada está presente en los modelos genéticos de crisis de ausencia. Debido a esto, la corriente potenciada de calcio tipo T fue identificada en las neuronas reticulares aisladas obtenidas de ratas adultas GAERS (Tsakiridou y cols., 1995). Además, la

microinyección de antagonistas para los receptores GABAB en el núcleo reticular talámico de relevo eliminó las descargas espiga-onda, probablemente removiendo el impulso hiperpolarizante dado por el componente lento medido por receptores de GABAB de los potenciales postsinápticos hiperpolarizantes que son requeridos para inactivar a la corriente de calcio tipo T (Tsakiridou y cols., 1995).

La importancia del tálamo en la generación de las crisis de ausencia fue reforzada por el descubrimiento realizado en el laboratorio de David Prince que los fármacos antiausencia tales como la etosuximida, reducían las corrientes de calcio tipo T en las células talámicas de relevo y cambian el patrón de descarga de las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular del tálamo (Coulter y cols., 1989, 1990). Unos años después Leresche y cols., (1998) confirmó que la etosuximida reducía las descargas en células tálamo-corticales de relevo mientras incrementaba su disparo tónico.

Mientras dilucidaba el rol prominente del tálamo en la fisiopatología de las crisis de ausencia, los estudios de Mircea Steriade y sus colaboradores (Timofeev y Steriade, 2004) se enfocaron hacia la corteza cerebral, empleando un modelo animal que asemeja el patrón EEG visto en pacientes con el síndrome de Lennox-Gastaut. Estos experimentos mostraron que las descargas de tipo espiga-onda corticales con una frecuencia 3Hz en neuronas de núcleo reticular del tálamo producían disparos de potenciales de acción que seguía cada espiga cortical y, a su vez, causaba potenciales postsinápticos hiperpolarizantes en las células talámicas de relevo (Steriade y Contreras, 1995). Estudios posteriores en gatos tratados con bicuculina confirmaron que las crisis electrográficamente similares a las crisis de ausencia reflejaban un fenómeno cortical que

no estaba influenciado por el tálamo, ya que su remoción no lo afectaba (Timofeev y Steriade, 2004). Por lo tanto, se propuso que en este modelo animal de síndrome de Lennox-Gastaut, en la corteza cerebral representa el sustrato mínimo para la generación de las crisis epilépticas. Estos experimentos también mostraron que la mayoría de las células de relevo tálamo-corticales generaron una constante hiperpolarización, así como potenciales postsinápticos hiperpolarizantes fásicos durante la crisis. Registros intracelulares obtenidos de células tálamo-corticales en las ratas GAERS mostraron patrones similares durante las descargas espiga-onda, así como una hiperpolarización tónica a lo largo de la secuencia espiga-onda, acompañando con potenciales postsinápticos hiperpolarizantes rítmicos (Pinault y cols., 1998).

En conclusión, la epilepsia de tipo crisis de ausencia es de carácter generalizado y se caracteriza por descargas de tipo espiga-onda en la corteza cerebral y se debe a cambios en el circuito tálamo-cortical mediada por corrientes de calcio tipo T. A la fecha solo se tienen dos modelos disponibles que son las ratas GAERS y las WAG/Rij. Sin embargo, en humanos el espectro de los pacientes afectados por esta condición es más diverso, por lo que se requieren de modelos adicionales que puedan abarcar el amplio espectro de esta patología en humanos.

Antecedentes

En 1989 Holmgren *et al*, en el Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla describieron una rata mutante de mielina a la que se le denominó “*taiep*” el cual es el acrónimo de los signos motores que la caracterizan temblor (primer mes), ataxia (3-4 meses), inmovilidad (6 a 9 meses), epilepsia de tipo audiogénica (2 a 10 meses) y parálisis de los miembros posteriores (12 meses en adelante; Cortés y Eguibar, 2005). La rata *taiep* muestra una hipomielinización inicial seguida de una desmielinización progresiva del sistema nervioso central (Lunn y cols., 1997). El carácter se hereda de manera autosómica recesiva (Holmgren y cols., 1989). Este modelo presenta descargas espiga-onda con frecuencia más alta mientras se encuentra despierta e incrementan con la administración sistémica de pentilinetetrazol y disminuyen con la administración de etosuximida (Cajellas, 2002). Por lo que se ha propuesto como un modelo de rata con crisis de ausencia asociada a un proceso de desmielinización del sistema nervioso central.

Al principio del nuevo milenio, dos estudios establecieron nuevamente que un incremento en la excitabilidad neuronal puede influenciar la frecuencia y la sincronización de las oscilaciones de la red neuronal talámica (Bal y cols., 2000; Blumenfeld y McCormick, 2000). En estos experimentos se aplicaron impulsos eléctricos asemejando impulsos corticales en las fibras cortico-talámicas cada vez que las células de relevo talámicas se activaran. Ambos grupos de investigadores encontraron que un estímulo débil cortico-talámico bloqueaba las oscilaciones espontáneas de tipo husos de sueño, mientras que

estímulos más intensos causaban oscilaciones más lentas y sincronizadas que dependían de la señalización mediada por el receptor GABAB. Por lo tanto, la fuerza de los impulsos cortico-talámicos influenciaba la ritmogénesis en el tálamo, y transformaba un ritmo tipo huso de sueño hacia uno muy similar al de una descarga tipo espiga-onda.

Sin embargo, la evidencia más contundente del rol que desempeñan las redes corticales provino de los experimentos en los que se aplicó un análisis de asociación no lineal a las señales EEG que fueron registradas a múltiples estructuras talámicas y corticales durante descargas espiga-onda en ratas WAG/Rij (Meeren y cols., 2002). Este enfoque analítico reveló que existe un sitio constante de iniciación localizado en la región perioral de la corteza somatosensorial, mientras que las descargas espiga-onda registradas en otros sitios de la corteza cerebral tuvieron un retraso y su latencia se incrementaba en función de la distancia del electrodo colocado en la zona perioral. Además, estos experimentos demostraron que los sitios corticales y talámicos interactuaron bidireccionalmente, pero durante los primeros 500 ms de las descargas de espiga-onda el sitio de iniciación cortical constantemente se dirigía hacia el tálamo (Meeren y cols., 2002). Poco después, Manning y cols., (2004) tuvo resultados similares al aplicar localmente de etosuximida en diferentes áreas corticales motoras y somatosensoriales en la rata GAERS. Adicionalmente, en este modelo genético de descargas espiga-onda, el área perioral fue el área de aplicación más efectiva para erradicar las crisis de ausencia. Recientemente, mediante registros intracelulares *in vivo* se ha mostrado que las descargas espiga-onda en las ratas GAERS inician en la capa 5/6 neuronal de la corteza somatosensorial (Polack y cols., 2007). Por lo tanto, las crisis de ausencia en estos dos modelos genéticos tienen un claro origen cortical.

Históricamente, una teoría focal cortical para la génesis de las crisis de ausencia en humanos se remonta a los registros estereotáxicos realizados por Bancaud en pacientes con epilepsia (Bancaud y cols., 1974). Estos estudios demostraron que las crisis de ausencia asociadas con las descargas espiga-onda bilaterales sincrónicas generalizadas pueden ser provocadas por la estimulación mesial frontal.

A su vez, recientemente se han realizado estudios sobre los diferentes factores que podían inducir generación de crisis epilépticas en animales y humanos, y uno de los factores más discutidos ha sido la intervención de los factores endocrinos como moduladores de la excitabilidad e inhibición neuronal. Las hormonas endócrinas son mensajeros químicos que son producidos por glándulas y liberadas al torrente sanguíneo. Interactuando con los órganos, las hormonas tienen una gran variedad de acciones y afectan diversas funciones y procesos (Crespo, 2018). Las hormonas tienen una fuerte influencia en la función encefálica desde la gestación y pueden afectar el umbral para las crisis epilépticas alterando la excitabilidad neuronal. El estrógeno potencia la excitabilidad neuronal experimentalmente y la progesterona lo disminuye, mientras que la testosterona y los corticoesteroides no tienen un efecto consistente sobre la actividad neuronal (Herzog, 2015). Los efectos hormonales en el sistema nervioso central varían dependiendo de la región del cerebro en donde se evalúen. Los sitios con más actividad de hormonas esteroides incluyen el hipotálamo y la corteza límbica, provocando un mecanismo de modulación conductual y de la función endócrina. Los patrones de crisis epilépticas cambian según la edad del paciente y pueden ser resultado de la acción de las hormonas, preferentemente las sexuales. En la pubertad, las crisis de ausencia normalmente cesan, mientras que la epilepsia mioclónica y la fotosensible se exacerban.

Otros tipos de epilepsia no responden significativamente los cambios debidos a la reproducción o durante la vejez que se asocian a procesos endócrinos. En algunas mujeres las fluctuaciones de hormonas durante los ciclos menstruales parecen incrementar la vulnerabilidad a presentar crisis epilépticas, probablemente refiriéndose a los cambios relativos en los niveles plasmáticos de estrógeno y progesterona. De hecho, las crisis epilépticas catameniales se asocian de manera estrecha al ciclo menstrual, lo que da un rol central a las hormonas esteroides sexuales en los cambios de excitabilidad neuronal y por lo tanto en la susceptibilidad a padecer crisis epilépticas. Es relevante que en distintos tipos de epilepsia las crisis disminuyen durante el embarazo debido a que los niveles circulantes de progesterona se incrementan. Después del parto, es frecuente que las crisis epilépticas se incrementen. Los patrones de las crisis epilépticas pueden cambiar para bien o para mal durante el embarazo. Ésta es un área que aún necesita más investigación. Un mejor entendimiento sobre el efecto endócrino sobre las crisis epilépticas puede llevarnos al desarrollo de terapias más efectivas.

Justificación

A la fecha, no hay muchos estudios que relacionen los factores endócrinos con la fisiopatología de la epileptogénesis de las crisis de ausencia. Este estudio ayudará a complementar la información que ya se conoce sobre los efectos de la progesterona en estas crisis con la inclusión de la rata *taiep* como un modelo de leucodistrofia del tipo de las tubulinopatías.

Hipótesis

H1. La progesterona exacerbará la frecuencia y duración de las crisis de ausencia en las ratas *taiep* hembras adultas.

H0. La progesterona no exacerbará la frecuencia y duración de las crisis de ausencia en las ratas *taiep* hembras adultas

Objetivo General

Evaluar el rol que juega la progesterona sobre las crisis de ausencia en la rata *taiep* bajo diferentes condiciones hormonales.

Objetivos específicos

- 1.- Determinar el rol de la progesterona sobre las crisis de ausencia en ratas *taiep* hembra adultas.
- 2.- Evaluar el efecto de la progesterona en ratas hembra adultas en diferentes condiciones endócrinas.

Metodología

Animales

Se emplearon ratas *taiep* hembra de 9 meses de edad. Se mantuvieron en jaulas de acrílico transparente con ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas, con temperatura controlada de 22 ± 2 °C, humedad relativa entre 30 y 40%, con alimento balanceado para roedores (Purina Mills, Estados Unidos) y agua purificada (Ciel™, Coca Cola Co., México) *ad libitum*. Las ratas fueron mantenidas durante 15 días, para después realizar mediante cirugía estereotáxica el implante para el registro EEG con electrodos de tornillo de acero inoxidable y cinco días de recuperación postcirugía. Las ratas fueron habituadas a las condiciones experimentales de registros durante tres horas, por tres días antes de los registros.

Implante de electrodos

Las ratas de nueve meses fueron anestesiadas con xilacina (5mg/Kg) y ketamina (75mg/Kg) administradas por vía intraperitoneal (i.p.). Bajo anestesia profunda, los

animales se montaron en un aparato estereotáxico tipo Kopf (Stoelting, Estados Unidos de América). Se realizó una incisión media a lo largo del cráneo, se removió el periostio con una legra y se implantó un electrodo bipolar en el área CA1 del hipocampo siguiendo las coordenadas del atlas esterotáxico de Paxinos y Watson (1989) (antero-posterior (AP): -4mm; medio-lateral (ML): -2.5mm; dorso-ventral (DV): -2.5. Utilizando la sutura de Bregma como referencia anatómica como se aprecia en la Figura 4. Se realizaron los trépanos dirigidos a las cortezas cerebrales frontal, parietal y occipital del lado izquierdo. Para los registros en la corteza cerebral se implantaron tornillos de acero inoxidable soldados a un alambre del mismo material. Adicionalmente, se colocaron dos electrodos de gancho en los músculos de la nuca para el registro electromiográfico y uno adicional en la parte superior de la órbita del ojo izquierdo para el registro del electrooculograma, y finalmente, un tornillo de acero inoxidable en la corteza frontal que se utilizará como tierra. Todos los electrodos se conectaron a un casquete de conexión múltiple (Plastics One, Inc., Estados Unidos de América) con terminales hembras recubiertas de oro para una adecuada transmisión de las señales eléctricas, fijándose al cráneo con acrílico dental (NicTone, México).

A partir del quinto día post-implante, los animales se adaptarán a las condiciones de registro en un cuarto sono-amortiguado y en condiciones medioambientales controladas por tres días.

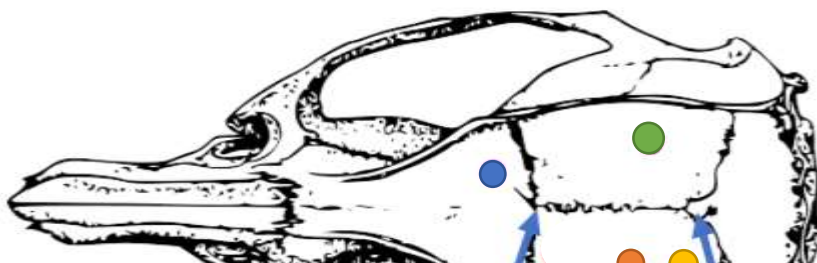


Figura 4. Diagrama del cráneo de una rata donde se pueden apreciar las suturas Bregma y Lambda. Se marcan los lugares en donde se realizaron los trépanos para el implante de los electrodos de hipocampo en la región CA1 (verde), corteza parietal (naranja), corteza occipital (amarillo) y corteza frontal (azul)

Tratamiento postcirugía

Los animales fueron colocados sobre un colchón térmico (Kaz Incorporated, Estados Unidos de América) hasta que se recuperaron del efecto de la anestesia, luego fueron colocados en jaulas individuales manteniéndolos en observación periódica.

Desde el día de la cirugía recibieron antibiótico Enroxil (32mg/Kg) y como analgésico Napzin (2mg/Kg), ambos fueron administrados por vía subcutánea (s.c.) en la región dorsal del cuello durante cinco días y evaluados bajo la supervisión del M.V.Z. Omar Isidro Maldonado certificado para el manejo de los animales de laboratorio.

Habitación pre-registro

Después del tratamiento post-cirugía, los animales fueron habituados a las condiciones experimentales durante tres horas una vez al día por tres días. La habituación se realizó en un cuarto sonoamortiguado, con un ciclo controlado de luz-oscuridad 12:12 (encendido de luces a las 0700 horas) y en cajas de acrílico transparente (21x 24.5 x 35 cm).

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los códigos y leyes del séptimo título de la Ley General de Salud del gobierno de México (NOM-062-ZOO-1999), los cuales corresponden a los de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (guía del NIH revisada en 2007).

Ovariectomía:

Para realizar la ovariectomía las ratas hembra fueron anestesiadas con xilacina (5mg/Kg) y ketamina (75mg/Kg) vía intraperitoneal. Bajo anestesia profunda, se cortó la piel y los músculos abdominales de la espalda a 1 cm por debajo de las costillas y 1 cm al lado de la columna vertebral de cada lado con unas tijeras tipo Mayo. Después, mediante pinzas de disección sin dientes se identificó la almohadilla de grasa que recubre al ovario, se localizó el ovario y se retrajo de la cavidad abdominal con las pinzas de disección o unas pinzas hemostáticas. Una vez extraído el ovario, se ejecutan dos suturas simples con hilo de seda a nivel de las trompas de Falopio, se corta con tijeras tipo Mayo y se extrae el ovario. El útero se regresa a la cavidad abdominal, se valora que no se tenga sangrado y se sutura por planos: peritoneo, músculo y piel separados con catgut o

seda según corresponda. Al final del procedimiento, se limpia el área con iodo y se le aplica Microdacyn (Sanfer, México) por tres días dos aspersiones por día.

Histerectomía

Se anestesió la rata con xilacina (5mg/Kg) vía i.p. y ketamina (75mg/Kg) vía i.p. Bajo anestesia profunda, se realizó una incisión de 3 a 4 cm en la línea media para abordar la cavidad abdominal. Después, con las pinzas de disección se identificó el útero y se hicieron dos puntos separados con seda con una separación de 0.5cm aproximadamente por arriba del cérvix y se cortó con una tijera tipo Mayo entre los dos puntos. Por último, con ayuda de dos pinzas de hemostasia, se elevó lenta pero firmemente el útero hasta que se pudieron ver ambos ovarios, luego se cortaron y cauterizaron los ovarios y suturó por planos.

Administración de fármacos y registro:

Se les administró la progesterona (Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América) a una dosis (20 mg/Kg) disuelto en 40% de aceite de oliva (Nutrioli, México) para permitir que la dosis de 20 mg/Kg se mantenga en una concentración constante de 0.2mL. Previo a esto, la hormona fue pesada en una microbalanza (Hanchen, Alemania) y se depositó en un tubo ámbar. Se le agregaron unas gotas de diclorometano (Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América), y se puso sobre una plancha caliente (ANSAI, Estados Unidos de América) y con agitación constante se agregó el aceite de oliva. La solución se mantuvo

el tiempo necesario hasta que el diclorometano se evaporó. Todos los registros fueron realizados entre las 08:00 y 16:00. Las ratas fueron conectadas a un amplificador multicanal mediante un cable flexible acoplado a un sistema de contacto continuo tipo swivel encargado de registrar el EEG y se les realizó un frotis vaginal antes de comenzar el registro EEG. Después de un registro control de 8 horas, se realizó otro registro postcirugía de 8 horas donde se les administró una dosis de la hormona (20 mg/Kg).

Protocolo experimental

El protocolo consistió en dos grupos experimentales aleatorizados, cada grupo constó de dos grupos de 5 ratas hembra *taiep* de 8 a 9 meses de edad a las cuales se les realizó una cirugía estereotáxica para el implante de los electrodos para el registro EEG. A cada rata se le realizaron dos registros con 8 horas de duración cada uno. Un registro control y otro registro donde se les administró una dosis de progesterona de 20 mg/Kg antes del inicio del registro a las 08:00.

Posteriormente, se realizó un registro EEG control de 8 horas de duración desde 08:00 hasta 16:00 realizando un frotis vaginal previo al inicio del registro para determinar que las condiciones hormonales de las hembras fueran constantes.

Un día después del registro control se les realizó una ovariectomía (Grupo 1) o una histerectomía con ovariectomía (Grupo 2) y se les administró analgésico y antibiótico durante tres días postcirugía.

Por último, se realizó un registro EEG con la administración de progesterona a una dosis de 20mg/Kg a las 08:00. El registro EEG tuvo una duración de 8 horas y se realizó un frotis vaginal para comprobar el estado hormonal de los sujetos previo al inicio del registro.

Grupo 1:

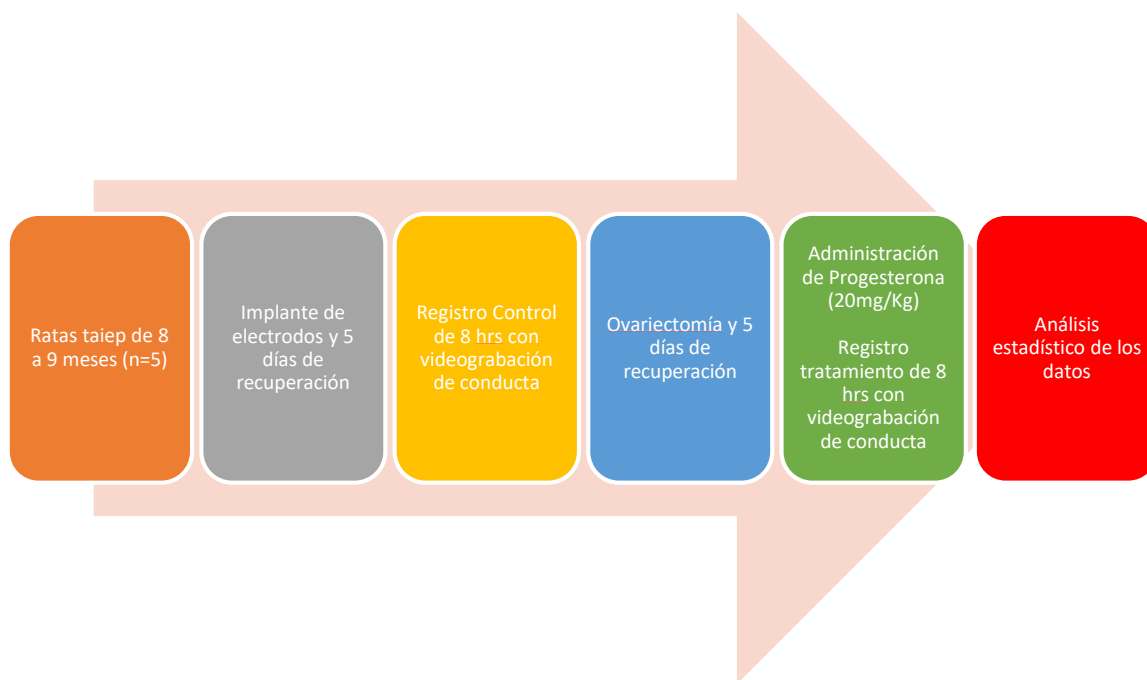


Figura 5. Diseño experimental empleado en las ratas del grupo 1. Se indica la n experimental y la edad de las ratas que se ocuparon (naranja); el primer procedimiento quirúrgico y los días de recuperación postcirugía (gris); el primer registro EEG (amarillo); el segundo tratamiento quirúrgico (azul); la administración de la hormona y el segundo registro EEG (verde); finalizando con la calificación de los registros y el análisis estadístico de los datos.

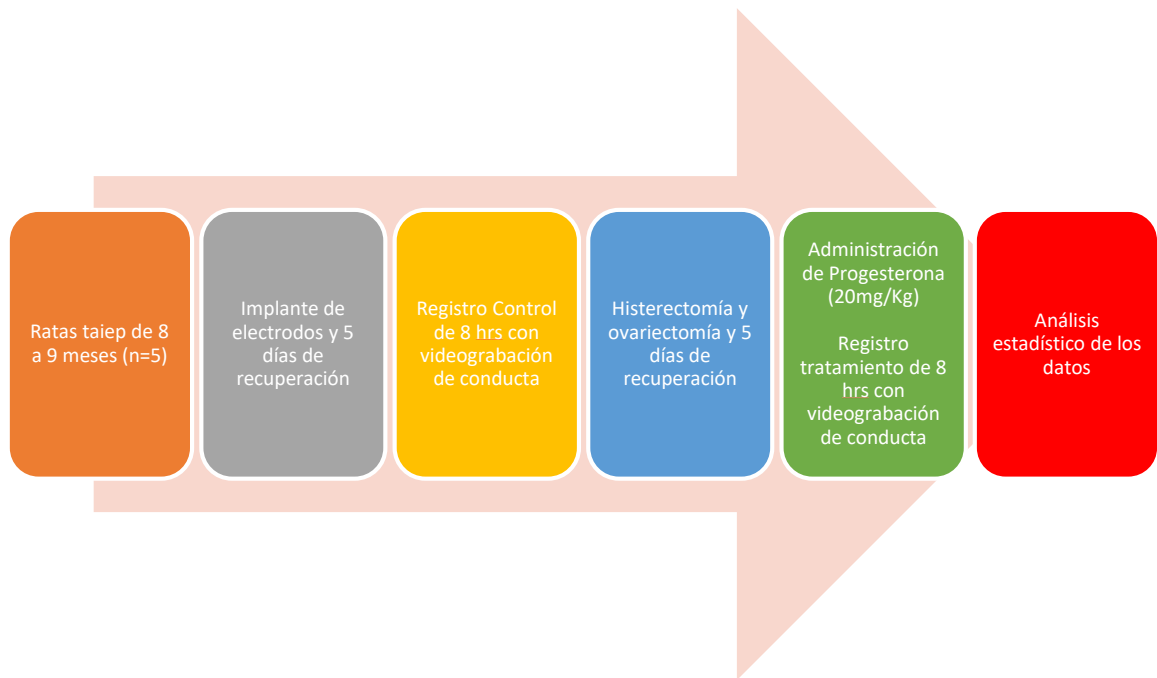


Figura 6. Diseño experimental empleado en las hembras del grupo 2. Se indica la n experimental y la edad de las ratas que se ocuparon (naranja); el primer procedimiento quirúrgico y los días de recuperación postcirugía (gris); el primer registro EEG (amarillo); el segundo tratamiento quirúrgico (azul); la administración de la hormona y el segundo registro EEG (verde); finalizando con la calificación de los registros y el análisis estadístico de los datos.

Recolección de datos y estadística:

Para realizar la estadística de los datos y las gráficas con los datos obtenidos se ocupó el programa Sigma Plot v. 11.0 (Sigma Stat, Estados Unidos de América). Así como para los análisis estadísticos, se fijó el nivel de significancia en un 5% por lo que una $P \leq 0.05$ se consideró como un efecto significativo entre los grupos de estudio.

Resultados

La administración de la progesterona no tuvo un efecto en la frecuencia de las crisis de ausencia en las ratas *taiep* ovariectomizadas (Grupo 1). (ANOVA, $F=2.691$, $gl=3$, $P=0.109$; los datos son la media \pm E.E.M), pero incremento significativamente la duración media en las primeras 4 h después de la administración hasta 5.69 ± 0.26 en comparación con el grupo control con tan solo 4.25 ± 0.36 , los datos fueron evaluados mediante una prueba de *t de Student* para muestras relacionadas con una $*P<0.5$; $n=5$ sujetos.

La latencia del grupo de ratas ovariectomizadas se vio aumentada de manera significativa. La latencia de la primera crisis fue desde 608.2 ± 166.53 hasta 910.20 ± 246.35 con la administración de la hormona y fue evaluado con una prueba *t de Student*.

En el grupo de ratas histerectomizadas (Grupo 2), la administración aguda de progesterona provocó un aumento significativo en la frecuencia de las crisis de ausencia a las 14 h desde 64.80 ± 19.94 hasta 99.20 ± 7.59 . Prueba de *t de Student*, $t=-1.55$, $gl=4$, $n=5$. $*P<0.05$. Sin embargo, la hormona disminuyó significativamente la duración media de las crisis de ausencia en las primeras 2 h después de la administración hasta 5.43 ± 0.21 en comparación con el grupo control 6.38 ± 0.22 . Prueba de la *t de Student*, $t=4.4$, $gl=228$, $***p<0.001$, $n=5$ sujetos, también se obtuvo una disminución significativa de la latencia en el grupo de ratas histerectomizadas a la primera crisis siendo de 1104.75 ± 195.10 y descendió hasta 642.75 ± 52.81 segundos con la administración de progesterona.

Resultados del grupo 1 con ovariectomía (OVX):

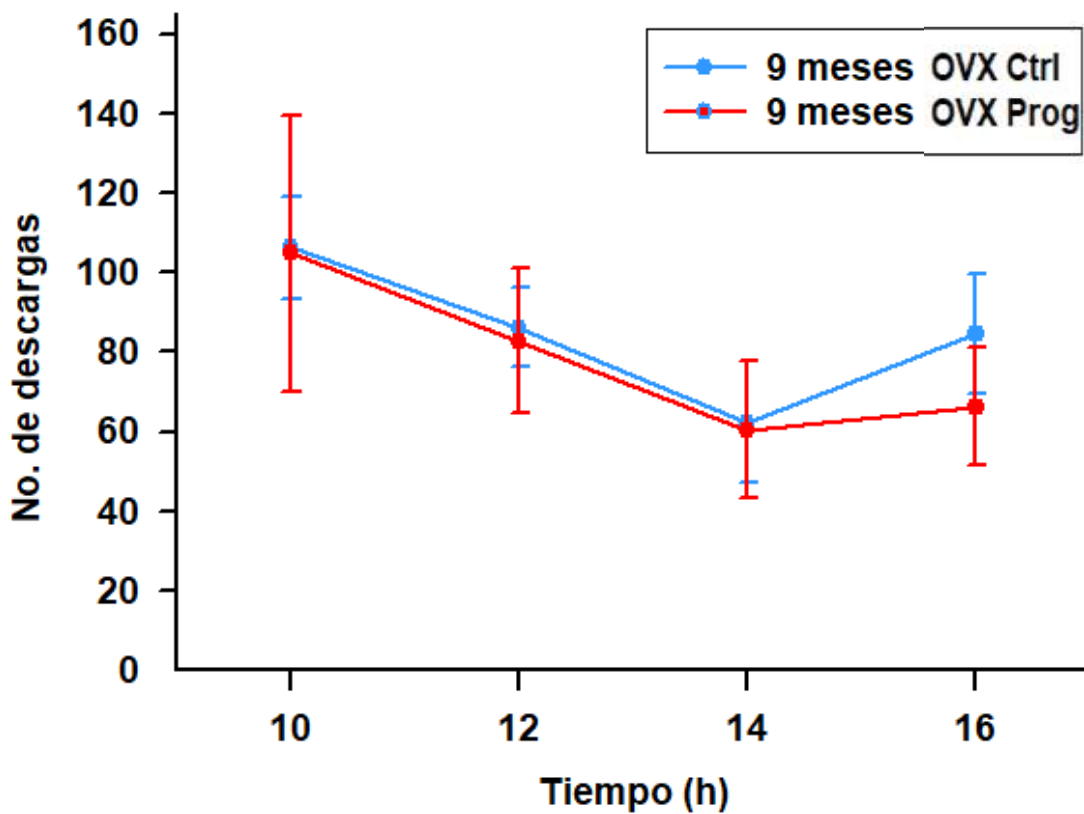


Figura 7 Frecuencias de crisis de ausencia en ratas ovariectomizadas y tratadas con progesterona grupo 1. La hormona no tuvo un efecto en la frecuencia de las crisis de ausencia en las ratas *taiep*. (ANOVA, $F=2.691$, $gl=3$, $P=0.109$; media \pm E.E.M).

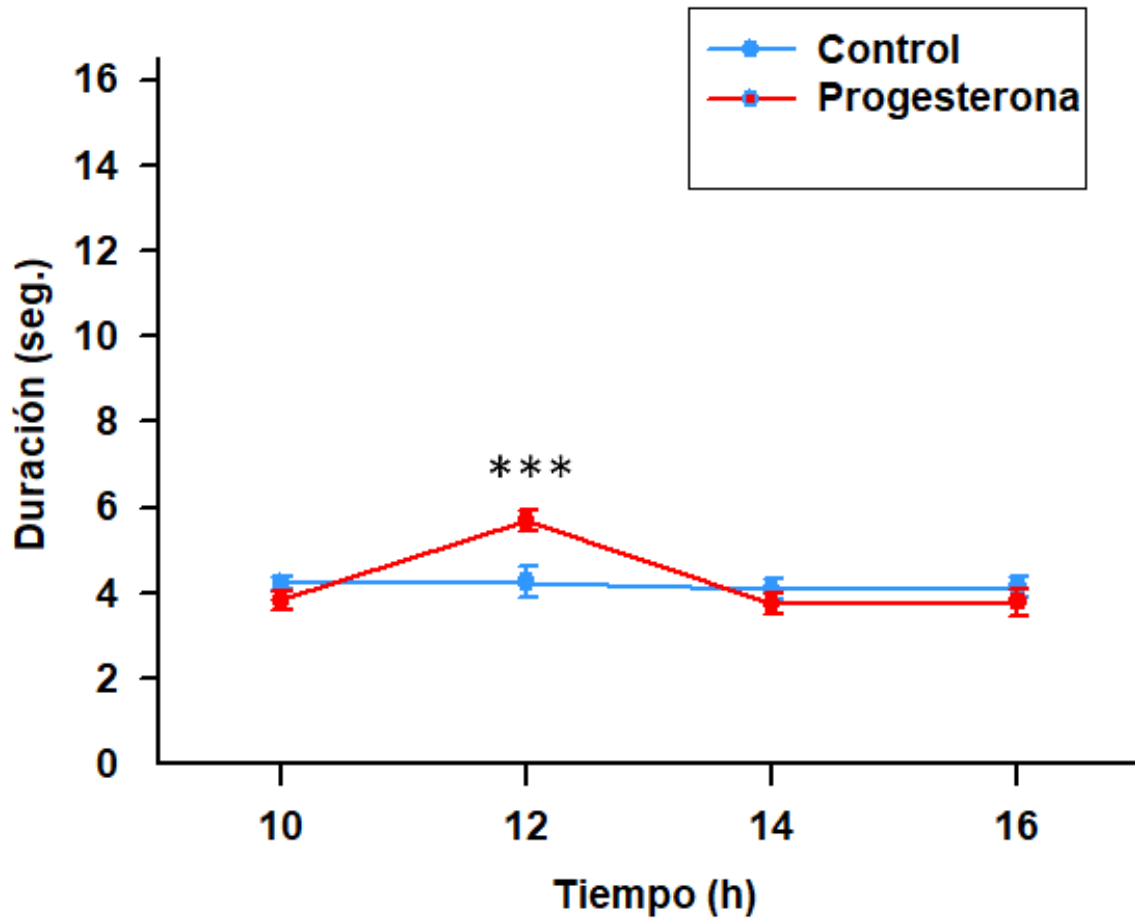


Figura 8. Duración de las crisis de ausencia en condiciones control y después de la administración de progesterona. La administración de progesterona aumentó significativamente la duración media de las crisis de ausencia en las primeras 4 h después de la administración hasta 5.69 ± 0.26 en comparación con el grupo control con tan solo 4.25 ± 0.36 . Prueba de la t de Student, $t=4.5$, $gl=300$, $***P<0.002$, $n=5$. Los resultados son la media \pm error estándar. Los resultados fueron evaluados mediante una prueba *t de Student* para muestras relacionadas con una $*P<0.5$. $n=5$. Media \pm error estándar de la media.

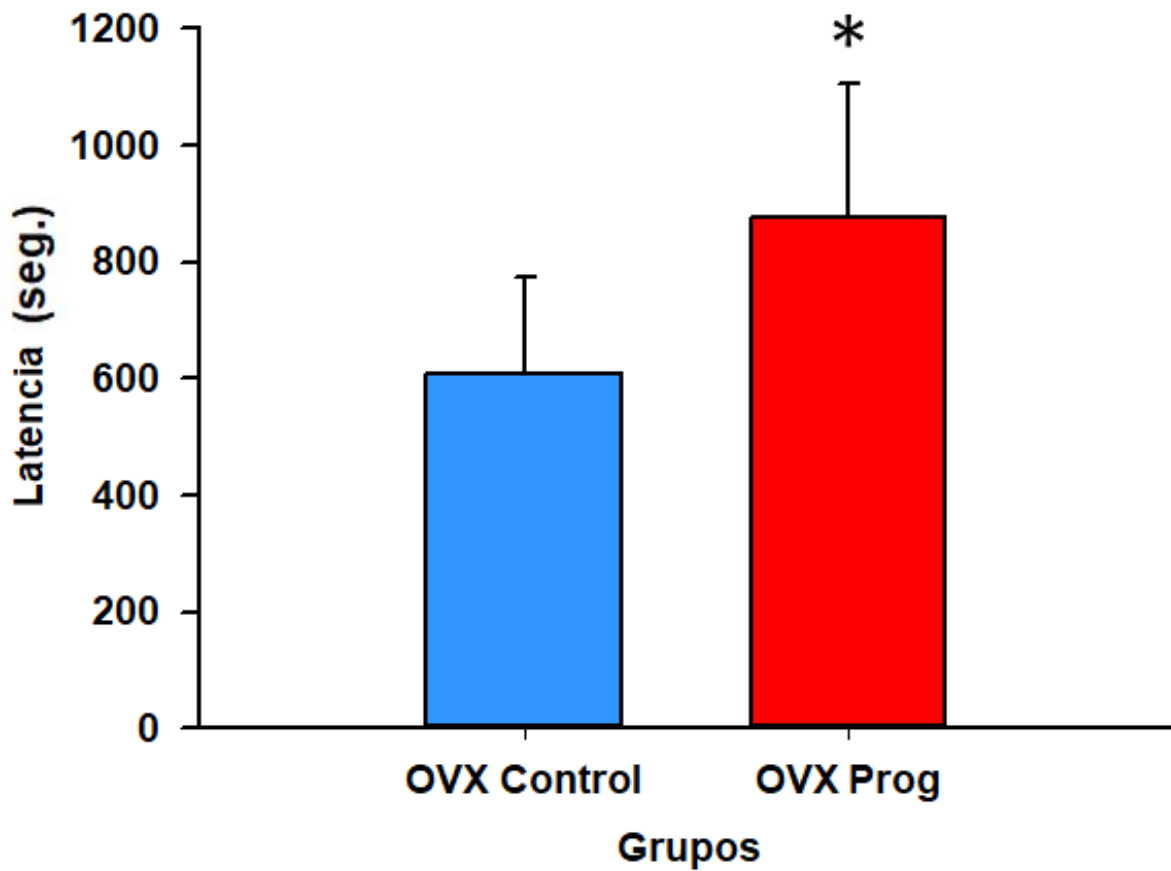


Figura 9. Latencia para presentar la primera crisis de ausencia en ratas ovariectomizadas y tratadas con progesterona. La administración de progesterona aumentó significativamente la latencia de la primera crisis desde 608.2 ± 166.53 hasta 910.20 ± 246.35 con la administración. Los datos son la media \pm el error estándar de la media.

Resultados del grupo 2 con histerectomía (HTX):

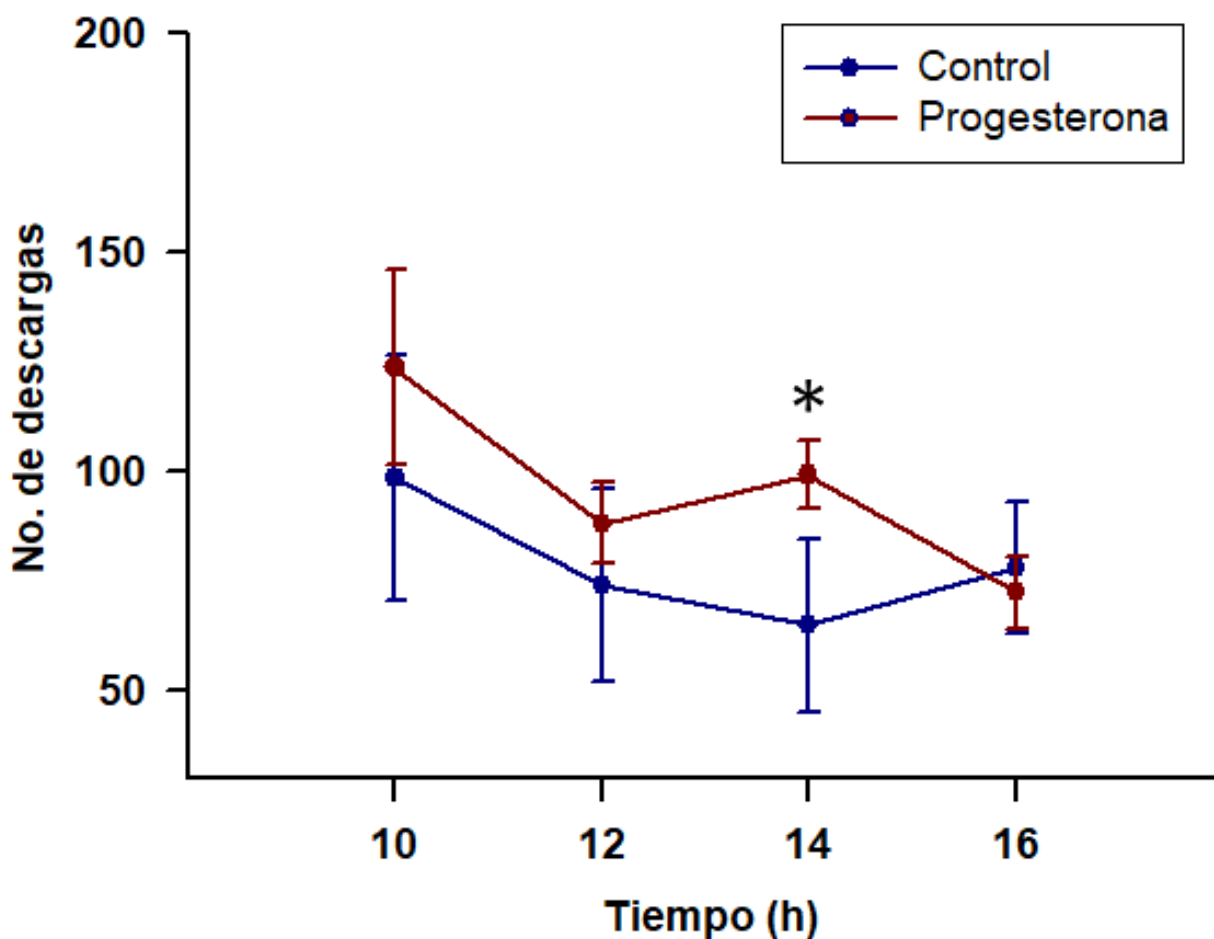


Figura 10. Frecuencias de crisis de ausencia en ratas *taiep* hembra histerectomizadas en condiciones control y tratadas con progesterona. La administración aguda de progesterona provocó un aumento significativo en la frecuencia de las crisis de ausencia a las 14 h desde 64.80 ± 19.94 hasta 99.20 ± 7.59 . Prueba de *t de Student*, $t=-1.55$, $gl=4$, $n=5$. $*P<0.05$. Los resultados muestran la media \pm el error estándar de la media.

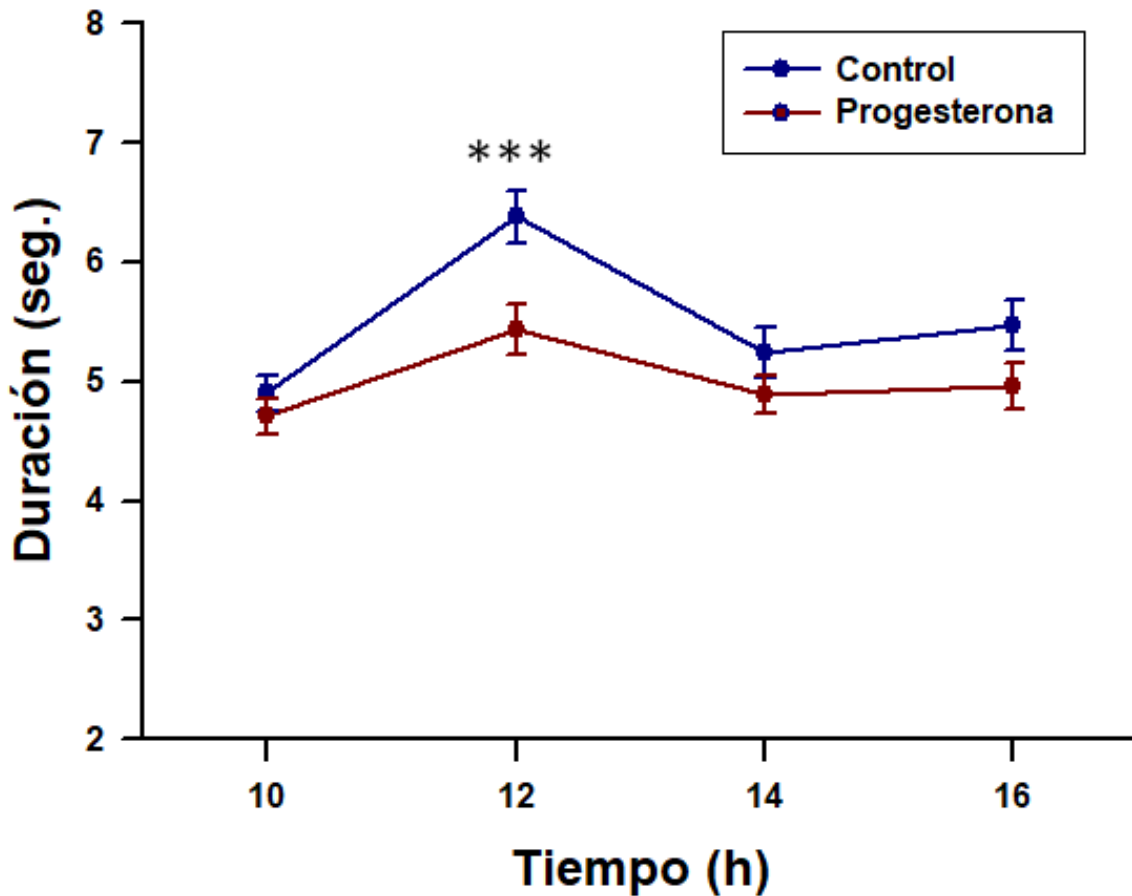


Figura 11. Duración promedio de las crisis de ausencia en el grupo 2. La hormona disminuyó significativamente la duración media de las crisis de ausencia en las primeras 2 h después de la administración hasta 5.43 ± 0.21 en comparación con el grupo control 6.38 ± 0.22 . Prueba de la *t de Student*, $t=4.4$, $gl=228$, $***P<0.001$, $n=5$. Los resultados son la media \pm error estándar de la media. Los resultados fueron evaluados mediante una prueba *t de Student* para muestras relacionadas con una $*P<0.5$. $n=5$. Los datos son la media \pm error estándar de la media.

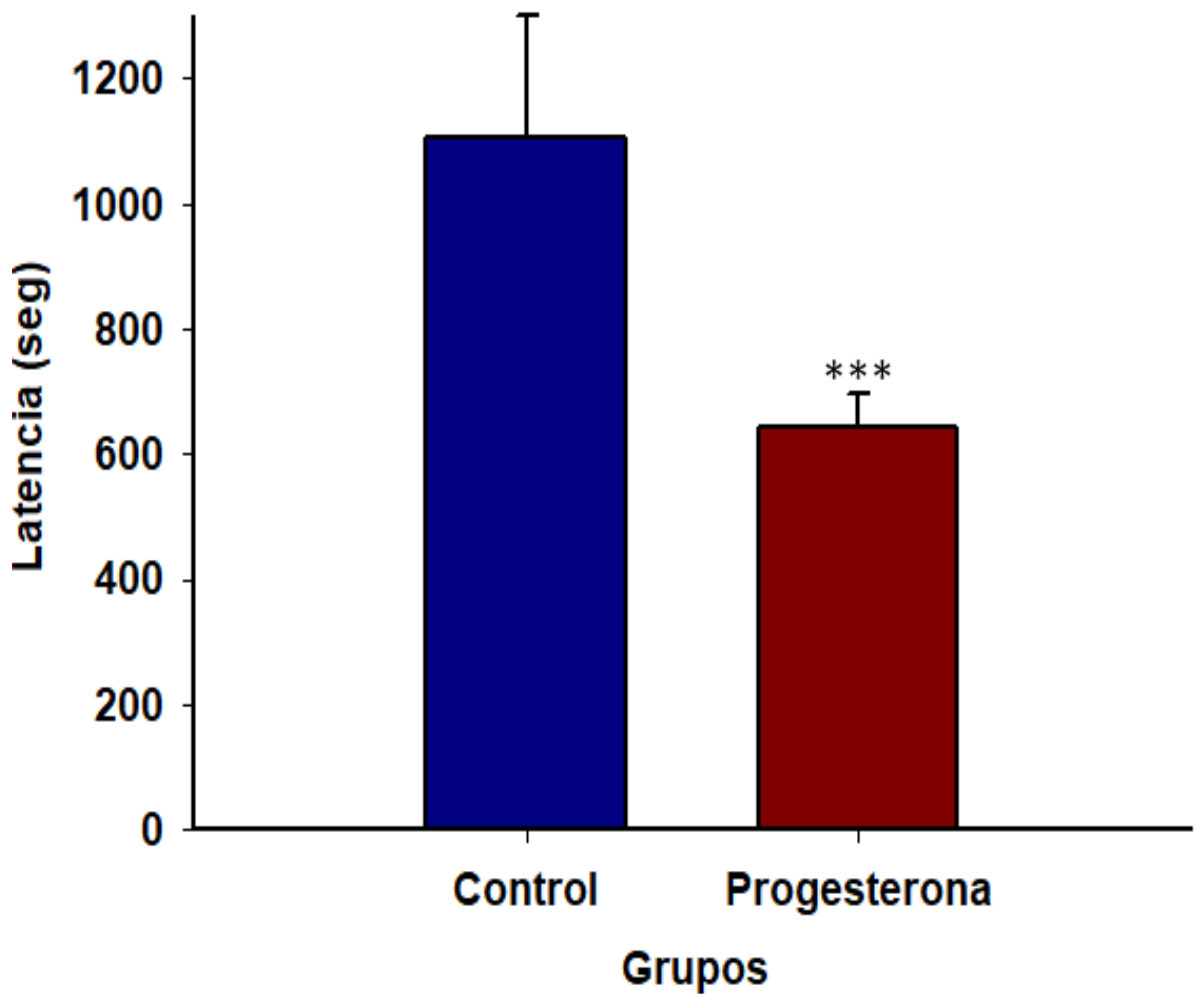


Figura 12. Latencia de la primera crisis de ausencia en las ratas *taiep* hembras histerectomizadas. La administración de progesterona en el grupo de histerectomía disminuyó significativamente la latencia de la primera crisis siendo de 1104.75 ± 195.10 hasta 642.75 ± 52.81 con la administración *** $P < 0.001$. Los resultados muestran la media \pm el error estándar de la media.

Discusión

Se sabe que los neuroesteroides aumentan la duración y la frecuencia de apertura del canal del receptor GABAA (Twyman y McDonald 1992). En este caso, más iones cloro (Cloro) migran al interior de la neurona siguiendo su gradiente de concentración, lo que produce una hiperpolarización. Así, en presencia de neuroesteroides, los receptores GABAA permanecen abiertos y su efecto inhibitorio de la neurotransmisión GABAérgica se incrementa. Este aumento de la inhibición GABAérgica provoca una exacerbación de las crisis de ausencia (Banerjee y Snead 1998).

En el presente estudio, el aumento de las convulsiones obtenido tras la administración sistémica de progesterona es coherente con estudios previos realizados en las ratas WAG/Rij (Persad y cols., 2002; Tolmacheva y van Luijtelaar 2007).

La exacerbación de las crisis de ausencia en humanos sólo fue reportada en un estudio tras la administración de progesterona (Grünewald et al. 1992). En nuestro estudio, en las ratas *taiep* hembras de nueve meses de edad se aumentó el número de descargas de tipo espiga-onda en el Grupo 2, al cual se le realizó una histerectomía total para disminuir la presencia de tejidos que poseen niveles elevados de receptores a esta hormona sensibles a la hormona e incrementar su biodisponibilidad. Esto produce que el efecto modulador de tipo alostérico de la alopregnanolona sobre los receptores GABAA de las neuronas tálamo-corticales se incremente.

Sin embargo, a las ratas hembra del Grupo 1, a las que solo les realizó una ovariectomía, no se obtuvo un cambio significativo en la frecuencia de las crisis y esto podría ser explicado porque el esteroide se unió a sus receptores presentes en ambos cuernos uterinos. Lo cual deja una poza menor de progesterona para metabolizarse en el cerebro hacia alopregnanolona. Entonces nuestro diseño experimental muestra claramente que la remoción del útero es importante para determinar con claridad el rol de la progesterona circulante sobre el cerebro en cantidades suficientes para su metabolismo. Esto podría explicar el aumento considerable en la frecuencia de las crisis de ausencia solo en las hembras del grupo 2.

Esta es una primera aproximación del rol de las hormonas esteroides femeninas y su efecto sobre las crisis de ausencia en un modelo de leucodistrofia como lo es la rata *taiep* (Garduno-Robles y cols., 2020; López-Juárez y cols., 2020). De hecho, en estudios de resonancia magnética en el cerebro de las ratas *taiep* a distintas edades mostraron una atrofia de los ganglios basales y del cerebelo, así como pérdida de la mielina en el cuerpo calloso y distensión de los ventrículos cerebrales (Garduno-Robles y cols., 2020). Adicionalmente, se ha podido determinar que las ratas *taiep* tienen una mutación puntual en la tubulina β 4A (TUBB4A). Esta mutación de las tubulinas afecta solo a los oligodendrocitos y es la base de los mecanismos de transporte de los ARNm y proteínas desde el núcleo hacia los procesos en los oligodendrocitos (Couve y cols., 1997; Song y cols., 2003; O'Connor y cols., 2000). De hecho, existe una acumulación de microtúbulos en el citoplasma y sus procesos que se propuso como un mecanismo que alteraba el

transporte en los oligodendrocitos de la rata *taiep* (Couve y cols., 1997; Lunn y cols., 1997).

Las alteraciones genéticas en la tubulina β 4A y las imágenes de resonancia magnética son exactamente iguales a las que se presentan en la leucodistrofia denominada hipomielinización con atrofia de los ganglios basales y cerebelo (H-ABC, de sus siglas en inglés). De manera relevante recientemente hemos reportado que tanto en las ratas *taiep*, como en un paciente que habita en Chiapas, México afectado de H-ABC que muestran alterados los potenciales provocados auditivos en sus componentes centrales lo que muestra que se afecta la mielina central sustentada por oligodendrocitos (López-Juárez y cols., 2020). La inmunohistoquímica de mielina muestra claramente alteraciones de la mielina central, pero no la periférica (López-Juárez y cols., 2020), lo novedoso de los hallazgos hizo que fuera la portada del Volumen 529, número 4 del 5 de abril 2020, en la prestigiosa revista Journal of Comparative Neurology (<http://DOI:10.1002/cne.24990>).

Es muy relevante que tanto el paciente con H-ABC, como las ratas *taiep* presentan alteraciones de los componentes centrales de los potenciales provocados auditivos como ya se había reportado en ratas *taiep* a edades más tempranas (Roncagliolo y cols., 2000; López-Juárez y cols., 2020). De hecho, los componentes centrales de los potenciales provocados somatosensoriales también están retrasados debido a la desmielinización (Benítez y cols., 1997; Roncagliolo y cols., 2000).

Estos hallazgos electrofisiológicos pueden corresponder a los cambios en la morfología del potencial de acción compuesto descrito en la preparación del nervio óptico *in vitro* (Roncagliolo y cols., 2006). De tal forma, que por una parte los cambios en la sincronía de los potenciales postsinápticos excitatorios registrados en las motoneuronas de la médula espinal *in vitro*; así como los potenciales postsinápticos excitatorios en las células piramidales del cuerno de Ammon en la preparación de rebanadas de hipocampo *in vitro* muestran disincronía, lo que contribuye a una neurotransmisión alterada en el mutante de mielina *taiep* (Bonansco y cols., 2004; Fuenzalida y cols., 2009; Eguibar y cols., 2014). Los cambios en las respuestas electrofisiológicas descritas pueden ser la base de las descargas tipo espiga-onda de las crisis de ausencia en ratas *taiep* macho y hembra (Cortés y cols., sometido a consideración editorial).

Las crisis de ausencia en las ratas *taiep* son sexualmente dimórficas, siendo los machos más susceptibles que las hembras (Cortés y cols., sometido a consideración editorial). Esto implica que las hembras se encuentran protegidas de las descargas espiga-onda, particularmente en la etapa reproductiva que fisiológicamente se asocia a cambios cíclicos en la secreción de esteroides sexuales: estrógenos y progesterona.

Los resultados de esta tesis muestran cambios en la duración de las crisis de ausencia y al prolongarse su duración se modifica el intervalo inter-crisis de las crisis de ausencia. Es necesario realizar experimentos para determinar el rol de los estrógenos sobre las crisis de ausencia en las ratas *taiep* hembras adultas.

En las ratas WAG/Rij se ha podido mostrar, que la administración de 17- β -estradiol no modificó la frecuencia de las crisis de ausencia (van Luijtelaar y cols., 2009; van Luijtelaar y cols., 2001) Por otra parte, la administración de progesterona incrementó la frecuencia y duración de las crisis de ausencia (Persad y cols., 2004; van Luijtelaar y cols., 2001; 2003).

De manera relevante, el metabolito 3 α -5 α -pregnenolona, también denominado alopregnenolona, produjo efectos similares a los obtenidos con la progesterona (Budziszewska y cols., 1999; van Luijtelaar y cols., 2009). Estos hallazgos farmacológicos correlacionan con las variaciones en la frecuencia de crisis de ausencia a lo largo del ciclo estral, que han mostrado que en la noche del proestro, cuando se produce la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, se incrementan los niveles circulantes de progesterona, con lo que se aporta evidencia adicional de que es la progesterona es un neuromodulador de la expresión de las crisis de ausencia.

Por último, el grupo de los Países Bajos, encabezados por el Dr. Gilles van Luijtelaar han podido mostrar que las crisis de ausencia disminuyen en la primera mitad del embarazo y se incrementan de manera considerable en la segunda mitad, lo que nuevamente correlaciona con los altos niveles de progesterona en el plasma en la segunda parte del embarazo en las ratas (Pawluski y cols., 2009; Tolmacheva y cols., 2004) El parto, el cual produce un descenso brusco de la progesterona, de manera concomitante disminuye las crisis de ausencia (Kovács y cols., 2017); y no es hasta la segunda semana del puerperio que se incrementa el número de las crisis

de ausencia que correlaciona nuevamente con cambios en los niveles plasmáticos de progesterona (Kovács y cols., 2017).

En conclusión, la progesterona es una hormona esteroide capaz de modular las crisis de ausencia en las ratas *taiep* hembras, un modelo de leucodistrofia asociado a las tubulinopatías, en particular a la enfermedad humana H-ABC.

Perspectivas

Determinar el rol de la progesterona o su metabolito la $5\alpha,3\alpha$ pregnenolona sobre las crisis de ausencia tanto por administración sistémica como administración local en el circuito tálamo-cortical que las produce y las sustenta.

Conclusión

La administración de progesterona tuvo un efecto significativo sobre la frecuencia y la latencia de las crisis de ausencia en la rata *taiep* ovariectomizadas e histerectomizadas. Sin embargo, no se encontraron efectos significativos de la

administración de la hormona sobre la duración de las crisis en este grupo. Esto implica que este esteroide sexual impacta el inicio de las crisis, pero no el tiempo que se activa el circuito tálamo-cortical que las sustenta.

A su vez, las ratas del grupo 1 que fueron sometidas a una ovariectomía presentaron un ligero incremento en la duración de las crisis mientras que la frecuencia de las mismas se mantuvo constante durante todo el registro.

Bibliografía

1. Avanzini G, Vergnes M, Spreafico R, Marescaux C. Calcium-dependent regulation of genetically determined spike and waves by the reticular thalamic nucleus of rats. *Epilepsia*. 1993; p. 34:1–7.
2. Ba"ckstro"m T, Zetterlund B, Blom S, Romano M. Effects of intravenous progesterone infusions on the epileptic discharge frequency in women with partial epilepsy. *Acta Neurol Scand* 1984; p. 69:240–8.
3. Berger J. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. Sebente Mitteilung. *Arch Psychiatr Nervenkr*. 1933; p. 100:301–320.
4. Berger J. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. Neunte Mitteilung. *Arch Psychiatr Nervenkr*. 1934; p. 102:225–242.
5. Blumenfeld H, McCormick DA. Corticothalamic inputs control the pattern of activity generated in thalamocortical networks. *J Neurosci*. 2000; p. 20:5153–5162.
6. Borowicz KK. Sex and seizure sensitivity. In: Schwartzkroin PA, editor. *Encyclopedia of basic epilepsy research*. Academic Press/Elsevier: UK; 2009. p. 519–22.
7. Cortés MC, Gavito B, Ita ML, Valencia, J, Eguibar JR. Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on taiep rats. *Synapse* 2005; p. 58:95-101.

8. Coulter DA, Huguenard JR, Prince DA. Specific petit mal anticonvulsants reduce calcium currents in thalamic neurons. *Neurosci Lett*. 1989; 98:74–78.
9. Fisher RS, Prince DA. Spike-wave rhythms in cat cortex induced by parenteral penicillin. II. Cellular features. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1977; p. 42:625–639.
10. Frankfurt M, Gould E, Woolley C, McEwen BS. Gonadal steroids modify dendritic spine density in ventromedial hypothalamic neurons: A Golgi study in the adult rat. *Neuroendocrinology* 1990; p. 51:530–5.
11. Frye CA, Rhodes ME. Male sex steroids and neuronal excitability. In: Schwartzkroin PA, editor. *Encyclopedia of basic epilepsy research*. Academic Press/Elsevier: UK; 2009. p. 507–13.
12. Frye CA, Rhodes ME. Female sex steroids and neuronal excitability. In: Schwartzkroin PA, editor. *Encyclopedia of basic epilepsy research*. Academic Press/Elsevier: UK; 2009. p. 477–84.
13. Frye CA. Hormonal influences on seizures: basic neurobiology. *Int Rev Neurobiol* 2008; p. 83:27.
14. Gervasi N, Monnier Z, Vincent P, Paupardin-Tritsch D, Hughes SW, Crunelli V, Leresche N. Pathwayspecific action of gamma-hydroxybutyric acid in sensory thalamus and its relevance to absence seizures. *J Neurosci*. 2003; p. 23:11469–11478.
15. Gibbs FA, Davis H, Lennox WG. The electroencephalogram in epilepsy and in conditions of impaired consciousness. *Arch Neurol Psychiatr*. 1935; p. 34:1135–1148.

16. Gibbs FA, Gibbs EL, Lennox WG. Epilepsy: a paroxysmal cerebral dysrhythmia. *Brain*. 1937; p. 60:377– 388.
17. Gloor, P. Neurophysiological bases of generalized seizures termed centrencephalic. In: Gastaut, H. Jasper, H. Bancaud, J., Waltregny, A., editors. *The physiopathogenesis of the epilepsies*. Charles C Thomas; Springfield, IL: 1969. p. 209-236.
18. Gloor, P. Evolution of the concept of the mechanism of generalized epilepsy with bilateral spike and wave discharge. In: Wada, JA., editor. *Modern perspective in epilepsy*. Eden Press; Montreal, QC: 1978. p. 99-137.
19. Gloor, P., Avoli, M., Kostopoulos, G. Thalamocortical relationships in generalized epilepsy with bilaterally synchronous spike-and-wave discharge. In: Avoli, M. Gloor, P. Kostopoulos, G., Naquet, R., editors. *Generalized epilepsy: neurobiological approaches*. Birkhauser; Boston, MA: 1990. p. 190-212.
20. González, Ma Isabel Crespo (2016). *Fisiopatología general*. Ediciones Paraninfo, S.A.
21. Gowers WR. *Epilepsy and other chronic convulsive diseases. Their causes, symptoms, and treatment*. New York: William Wood; 1885.
22. Grünwald R, Aliberti V, Panayiotopoulos C: Exacerbation of typical absence seizures by progesterone. *Seizure* 1; 1992; p. 137–138
23. Herzog AG. Catamenial epilepsy update on pathophysiology, prevalence and treatment from the findings of the NIH Progesterone treatment trial. *Seizure* 2015; p. 28:18–25.

24. Holmgren B, Urbá-Holmgren R, Riboni L, Vega-Sáenz de Miera EC. Sprague-Dawley rat mutant with tremor, ataxia, tonic immobility episodes, epilepsy and paralysis. *Lab Anim Sci* 1989; p. 39:226-228.
25. Jasper HH. Diffuse projection systems: the integrative action of the thalamic reticular system. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1949; 1:405–420.
26. Laidlaw J. Catamenial epilepsy. *Lancet* 1956; p. 271:1235–7.
27. Logothetis J, Harner R, Morrell F, Torres F. The role of estrogens in catamenial exacerbation of epilepsy. *Neurology* 1959; p. 9:352–60.
28. Manning JA, Douglas AR, Bowery NG. Pharmacology of absence epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 2003; p. 24:542-549.
29. Marcus EM, Watson CW. Bilateral synchronous spike waves electrographic patterns in the cat. Interaction of bilateral cortical foci in the intact, the bilateral cortical-callosal, and adiencephalic preparation. *Arch Neurol.* 1966; p. 14:601–610.
30. Marcus EM, Watson CW. Symmetrical epileptogenic foci in monkey cerebral cortex. Mechanisms of interaction and regional variations in capacity for synchronous discharges. *Arch Neurol.* 1968; p. 19:99–116.
31. Marcus EM, Watson CW, Goldman PL. Effects of steroids on cerebral electrical activity. *Arch Neurol* 1966; p. 15:521–32.
32. Massimo Avoli. A brief history on the oscillating roles of thalamus and cortex in absence seizures. *Epilepsia.* 2012.

33. McGinnis MY, Gordon JH, Gorski RA. Time course and localization of the effects of estrogen on glutamic acid decarboxylase activity. *J Neurochem* 1980; p. 34:785–92.
34. Meeren HK, Pijn JP, Van Luijtelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci*. 2002; p. 22:1480–1495.
35. Morrell MJ, Sarto GE, Shafer PO, y cols. Health issues for women with epilepsy: a descriptive survey to assess knowledge and awareness among healthcare providers. *Journal of Womens Health and Gender-Based Medicine* 2000; p. 9:959.
36. Nohria V, Giller E. Ganaxolone. *Neurotherapeutics* 2007; p. 4:102.
37. Olafsson E, Hallgrimsson JT, Hauser WA, y cols. Pregnancies of women with epilepsy: a populationbased study in Iceland. *Epilepsia* 1998; p. 39:887.
38. Prince DA. Topical convulsant drugs and metabolic antagonists. In: Purpura DP, Penry JK, Tower DB, Woodbory DM, Walter RD, editors. *Experimental models of epilepsy*. New York: Raven Press; 1972. p. 51–83.
39. Penfield W. Epileptic automatism and the centrencephalic integrating system. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1952; p. 30:513–528.
40. Penfield, W. Consciousness and centrencephalic organization. *Premier Congres International des Sciences Neurologiques; Bruxelles*. 1957. p. 7-18.
41. Penfield W, Jasper HH. Highest level seizures. *Res Publ Ass Res Nerv Ment Dis*. 1947; p. 26:252–271.

42. Penfield, W., Jasper, HH. Epilepsy and the functional anatomy of the human brain. Little Brown y Co; Boston, MA: 1954.
43. Pinault D, Leresche N, Charpier S, Deniau JM, Marescaux C, Vergnes M, Crunelli V. Intracellular recordings in thalamic neurones during spontaneous spike and wave discharges in rats with absence epilepsy. *J Physiol.* 1998; p. 509:449–456.
44. Reddy DS. Role of neurosteroids in catamenial epilepsy. *Epilepsy Res* 2004; p. 62:99.
45. Reddy DS, Kim HY, Rogawski MA. Neurosteroid withdrawal model of perimenstrual catamenial epilepsy. *Epilepsia* 2001; p. 42:328.
46. Reddy DS, Rogawski MA. Enhanced anticonvulsant activity of neuroactive steroids in a rat model of catamenial epilepsy. *Epilepsia* 2001; p. 42:337.
47. Reddy DS, Rogawski MA. Neurosteroid replacement therapy for catamenial epilepsy. *Neurotherapeutics* 2009; p. 6:392.
48. Scharfman HE, MacLusky NJ. The influence of gonadal hormones on neuronal excitability, seizures, and epilepsy in the female. *Epilepsia* 2006; p. 47:1423
49. Slaght SJ, Leresche N, Deniau JM, Crunelli V, Charpier S. Activity of thalamic reticular neurons during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *J Neurosci.* 2002; p. 22:2323– 2334.
50. Smith SS, Waterhouse BD, Woodward DJ. Sex steroid effects on extrahypothalamic CNS. I. Estrogen augments neuronal responsiveness to

- iontophoretically applied glutamate in the cerebellum. *Brain Res* 1987; p. 422:40–51.
51. Smith SS, Waterhouse BD, Woodward DJ. Locally applied estrogens potentiate glutamate-evoked excitation of cerebellar Purkinje cells. *Brain Res* 1988; p. 272–82.
52. Smith SS, Woolley CS. Cellular and molecular effects of steroid hormones on CNS excitability. *Cleve Clin J Med* 2004; p. 4–10.
53. Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*. 1993; p. 262:679–685.
54. Taubøll E, Lindstrøm S, Gjerstad L. Acute effects of 17 β -estradiol on brain excitability studied in vitro and in vivo. *Epilepsy Res* 1994; p. 18:107–17.
55. Taubøll E, Røste LS, Svalheim S. Catamenial epilepsy. In: Harden CL, Thomas SV, Tomson T, editors. *Epilepsy in women*. UK: John Wiley y Sons Ltd.; 2013. p. 41–52.
56. Taubøll E, Lindstrøm S. The effect of progesterone and its metabolite 5 α pregnan-3 α -ol-20-one on focal epileptic seizures in the cat's visual cortex in vivo. *Epilepsy Res* 1993; p. 14:17–30
57. Timofeev I, Steriade M. Neocortical seizures: initiation, development and cessation. *Neuroscience*. 2004; p. 123:299–336.
58. Tissot, SAD. *Traité de l'épilepsie*. François Grasset et Comp; Lausanne: 1783.
59. Tolmacheva EA, Oitzl MS, van Luijtelaar G: Stress, glucocorticoids and absences in a genetic epilepsy model. *Horm. Behav.* 2012; p. 61, 706–710

60. Tolmacheva EA, van Luijtelaar G: The role of ovarian steroid hormones in the regulation of basal and stress induced absence seizures. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007; 104, p. 281–288
61. Van Luijtelaar G, Sitnikova E. Global and focal aspects of absence epilepsy: the contribution of genetic models. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006; p. 30:983-1003.
62. Van Luijtelaar EL, Coenen AM. Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats. *Neurosci Lett.* 1986; p. 70:393–397.
63. Vergnes M, Marescaux C, Micheletti G, Reis J, Depaulis A, Rumbach L, Warter JM. Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neurosci Lett.* 1982; p. 33:97–101.
64. Velisek L, Nebieridze N, Chachua T, Veliskova J. Anti-seizure medications and estradiol for neuroprotection in epilepsy: the 2013 update. *Recent Pat CNS Drug Discov.* p. 24-41.
65. Wallis CJ, Luttge WG. Influence of estrogen and progesterone on glutamic acid decarboxylase activity in discrete regions of rat brain. 1980; p. 34:60913
66. Woolley CS. Hormones and epilepsy. In: Schwartzkroin PA, editor. *Encyclopedia of basic epilepsy research.* UK: Academic Press/Elsevier; 2009. p. 495–501.
67. Woolley CS, McEwen BS. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *J Neurosci* 1994; p. 14:76807.