



**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO HORMONAL (PROPIONATO DE TESTOSTERONA [T<sub>4</sub>] EN HEMBRAS Y TAMOXIFEN EN MACHOS) DURANTE EL PERIODO DE DIFERENCIACIÓN SEXUAL HIPOTALÁMICA DE LA RATA Y SU REPERCUSIÓN EN LA LABILIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO A TRAVÉS DE LA SENSIBILIDAD A LAS CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR PTZ (PENTILENTETRAZOL)**

**T E S I S**

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA**

**Biol. Edgar Mariano San Agustín Paredes**

**Comité Tutoral:**

**Directora de tesis**

**Dra. Marcela Vergara Onofre**

**Codirector de tesis**

**Dr. Alejandro Valdés Cruz**

**Asesores:**

**Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez**

**Dr. Héctor Armando Herrera Gutiérrez**

**Dr. David Martínez Vargas**

**Dr. Víctor Manuel Magdaleno Madrigal**

**Ciudad de México Mayo 2018**

## Índice

1. Agradecimientos.....	3
2. Abreviaturas.....	4
3. Resumen.....	6
4. Introducción.....	7
5. Diferenciación sexual .....	8
6. Estructuras del sistema nervioso que intervienen en el dimorfismo sexual .....	10
7. Diferencias Genéticas.....	11
8. Diferencias Anatómicas y fisiológicas.....	12
9. Bases moleculares de diferenciación sexual del circuito neuronal.....	12
10. Diferencias conductuales en el macho y la hembra.....	13
11. Periodo crítico.....	13
12. Mecanismo de acción de esteroides.....	14
13. Crisis convulsivas.....	15
14. Papel de las hormonas en las crisis convulsivas.....	15
15. Progesterona (P4).....	16
16. Testosterona (T4).....	16
17. Estrógenos.....	17
18. Tamoxifen.....	17
19. Diferencias del género en las crisis convulsivas.....	18
20. Modelos convulsivantes.....	19
21. Electroencefalografía.....	19
22. Modelo Pentilenetrazol (PTZ).....	20
23. GABA.....	21
24. Receptores GABA.....	21
25. Recaptación y degradación de GABA.....	22
26. Planteamiento del problema.....	23
27. Objetivo General.....	23
28. Objetivos Particulares.....	23
29. Hipótesis.....	23
30. Metodología.....	24
31. Actividad electroencefalográfica.....	25
32. Análisis del poder espectral.....	25
33. Análisis estadístico.....	26
34. Resultados 7 días de edad.....	27
35. Resultados prepuberales.....	28
36. Resultados pospuberales.....	28
37. Actividad EEG en una rata tratada.....	29
38. Actividad EEG 7 días.....	30
39. Actividad EEG prepuberales.....	32
40. Actividad EEG pospuberales.....	34
41. Discusión.....	36
42. Conclusiones.....	44
43. Perspectivas.....	45
44. Bibliografía.....	46
45. Anexo 1.....	56
46. Anexo 2.....	57

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco** por haberme aceptado a ser parte de ella, en especial a la **Dra. Marcela Vergara Onofre** por su amistad, paciencia, dedicación y ayuda, pero sobre todo por inspirar aquellos deseos de seguir adelante, a pesar de los obstáculos que se van presentando, así como su comprensión y apoyo en los momentos más difíciles a lo largo del trayecto, siendo éste, no únicamente en la etapa laboral.

Al **Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente Muñiz** donde se realizó la mayor parte del trabajo experimental, por abrir sus puertas para realizar y formar parte de este sueño. A los integrantes del **Laboratorio de Neurofisiología del Control y la Regulación**, docentes, compañeros y amigos, por su incondicional apoyo en todas las circunstancias, en especial al **Dr. Alejandro Valdés Cruz** por brindarme su conocimiento, orientación, amistad y apoyo en todas las situaciones presentadas, así como la inyección de entusiasmo y optimismo, proporcionando las herramientas necesarias para poder realizar satisfactoriamente cada parte de este trabajo, contagiando aquel anhelo de aspirar a obtener más logros.

A **Hilda Gutiérrez Huesca** que además de ser una gran compañera y amiga es una excelente persona, la cual, sin ella, no hubiera tenido el mismo sentido la realización de este trabajo, lográndolo hacer más liviano, contando con su incondicional apoyo, siempre proporcionando aquel panorama de tranquilidad en aquellos momentos más complicados.

A mis padres: **Sonia Esther Paredes Can** y **José Mariano San Agustín Martínez** por haberme apoyado en cada uno de mis sueños y aspiraciones, los cuales, a la fecha siguen haciéndolo incondicionalmente formando parte esencial de cada peldaño.

A **Esmeralda Huerta San Agustín**, que además de ser mi sobrina, es aquella chispa que inyecta la alegría y las ganas de seguir luchando por lo que uno realmente sueña.

A **mi familia**, la cual siempre ha estado a mi lado, siempre apoyándome a salir adelante, y a seguir hasta donde se pueda llegar.

## **Abreviaturas**

Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Acido gamma aminobutírico (GABA)

Ácido glutámico descarboxilasa (GAD)

Adenosin trifosfato (ATP)

Alfa-fetoproteína (AFP)

Amígdala media (MeA)

Área preóptica (POA)

Balance energético negativo (NEB)

Cama del núcleo de la estría terminal (BNST)

Convertidor analógico digital (AD)

Corteza fronto-parietal derecha (Cx FP-Der)

Corteza fronto-parietal izquierda (Cx FP-Izq)

Crisis convulsiva generalizada (CCG)

Crisis generalizadas tónico clónicas (CGTC)

Electroencefalografía (EEG)

Epilepsia de lóbulo temporal (TLE)

*Estatus epilepticus* (SE)

Estradiol (E<sub>2</sub>)

Estría terminal (ST)

Hipotálamo – hipófisis – gónada (HHG)

Hipotálamo ventromedial (VMH)

Hormona folículo estimulante (FSH)

Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

Hormona luteinizante (LH)

Intraperitoneal (i.p.)

Modelo de electroshock máximo (MES)

Núcleo anteroventral periventricular (AVPvN)

Núcleo arcuato hipotalámico (ARCN)

Núcleo dimórfico sexual del área preóptica (SDN-POA)

Núcleo supraquiasmático (NSQ)

Núcleos de la cama de la estría terminal (NCET)

Parte ventrolateral del núcleo ventromedial (VL-VNM)

Pentilenetetrazol (PTZ)

Picrotoxina (PTX)

Progesterona (P<sub>4</sub>)

Prostaglandina (PGE<sub>2</sub>)

Proteína precursora beta amiloide (APP)

Receptor a estrógenos alfa (RE $\alpha$ )

Receptor a estrógenos beta (RE $\beta$ )

Sistema nervioso central (SNC)

Sistema nervioso periférico (SNP)

Testosterona (T<sub>4</sub>)

Transformada de Fourier (FT)

Transportadores de alta afinidad a GABA (GAT)

Tratamiento para lesión cerebral (LTC)

Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL)

## Resumen

Los xenoestrógenos inducen alteraciones en el sistema nervioso central (SNC) y neuroendocrino alterando la reproducción animal. Estos efectos son evidentes en el periodo crítico del dimorfismo sexual, lo que puede provocar mayor susceptibilidad a enfermedades del SNC. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue identificar cambios en la excitabilidad cerebral en animales con tratamiento hormonal aplicado en el periodo crítico de dimorfismo sexual. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar con padres probados. Se realizó el frotis vaginal en las hembras diariamente verificando el ciclo estral en tres periodos. Se colocaron hembras y machos para permitir apareamiento. Las crías recién nacidas se sexaron y a la hora del nacimiento se aplicó el tratamiento hormonal y fueron regresadas a la madre. En los días postnatal 7, prepúber y postpúber los animales fueron implantados, registrados electrográficamente e inducidos a crisis convulsivas con pentilene-tetrazol (PTZ). Las variables analizadas fueron número de dosis para la primera crisis convulsiva generalizada (CCG), número de dosis para alcanzar *status epilepticus*, número de crisis presentadas y cambios en la actividad electroencefalográfica (EEG) por medio de un análisis espectral. Nuestros resultados muestran que a los siete días de edad, las hembras tratadas necesitaron mayor número de dosis para presentar *status epilepticus*. Sin embargo los machos tratados presentaron la primera CCG con mayor dosis, lo que sugiere que hay cambios en los mecanismos que intervienen en la respuesta para presentar CCG. En animales prepuberales las hembras presentan una disminución en el número de dosis para presentar *status epilepticus*, así como en el número de dosis para presentar la primera CCG indicando que las hembras tratadas presentan mayor susceptibilidad del SNC mostrando que la interrupción hormonal durante el periodo crítico de diferenciación sexual es una etapa esencial en el desarrollo tardío del SNC, indicando también una diferencia de género en el desarrollo del SNC ya que los machos no presentaron cambios significativos durante esta etapa. A los 60 días de edad no se presentaron cambios estadísticamente significativos indicando que a esta edad los mecanismos cerebrales que intervienen en la maduración para llegar a la etapa adulta, ya fueron realizados, por lo cual no se presentan cambios con ninguno de los diferentes tratamientos con respecto al grupo control. Las conclusiones de este trabajo es que el tratamiento hormonal durante el periodo crítico de diferenciación sexual es una etapa esencial involucrada en el desarrollo del SNC.

## Introducción

El tipo de alimentación juega un papel determinante en la regulación hormonal que interviene en el periodo reproductivo, en el cual intervienen las hormonas sexuales liberadas por órganos correspondientes del eje HHG (hipotálamo-hipófisis-gónada) (Leroy, 2014; Wang, 2016).

Los esteroides anabólicos son una clase de hormonas esteroides basados en testosterona ( $T_4$ ) androgénica y se reconoce por sus efectos sobre la construcción de músculo y son usados como fármacos potenciadores del rendimiento. Además, en la mejora del crecimiento y conversión a alimentos en animales productores y rebaños lecheros de alto rendimiento (Mohammed, 2016; Leroy 2014). Estos efectos pueden ser atribuidos a tejidos que intervienen en el proceso de construcción, indirectamente en la síntesis de proteínas involucrada en la vía de estimulación de la hormona de crecimiento (Mohammed, 2016).

En las hembras, la alimentación con diferentes tipos de grasas también tienen efectos en el útero, cuerpo lúteo, folículo, oocito o embrión y estos efectos son indirectos, los cuales son mediados por cambios en el balance energético y en la señalización endocrina, ambas cuestiones (suplementos alimenticios grasos y hormonales) tienen impacto en la fisiología reproductiva (Leroy, 2014).

Los suplementos hormonales que contienen estrógenos, juegan un papel importante en la regulación intraovárica de la foliculogénesis para actuar sobre receptores ováricos específicos, induciendo también, la proliferación celular uterina durante la fase folicular tardía del ciclo estral (Hsueh et al., 2015; Wang, 2016). La salud metabólica en vacas lecheras durante el periodo de transición se asocia con deterioro del rendimiento reproductivo, en términos de anovulación o mortalidad embrionaria (Leroy, 2014).

En los machos, las hormonas juegan un papel importante no únicamente en el control sobre el desarrollo testicular, sino también en el funcionamiento de éste y en la espermatogénesis (Mohammed, 2016). Se ha documentado una baja calidad de semen, así como también una baja en la concentración de  $T_4$  en la circulación en machos, que coinciden con modificaciones en el medio ambiente y estilo de vida que pueden contribuir directamente a la disminución de la función testicular (Mínguez-Alarcón, 2017). Los suplementos alimenticios de ácidos grasos *trans* dan como resultado incapacidad reproductiva, incluyendo la acumulación de estas grasas en el testículo, disminuyendo las concentraciones séricas de  $T_4$ , afectando el recuento de espermatozoides, detención de la espermatogénesis y degeneración testicular (Mínguez-Alarcón, 2017).

Se han encontrado varias vías que describen el origen del fallo reproductivo, resumiendo los factores de riesgo, en particular, las interacciones entre el balance energético negativo (NEB), muchos estudios han reportado un inquietante decremento en la actuación reproductiva en recientes décadas, es un problema complejo con causas multifactoriales (Leroy, 2014), hay una estrecha correlación hormonal-conductual, las cuales actúan en el ejercicio físico, estrés, comportamiento sexual y nutrición, así como también influye en la liberación y en las concentraciones hormonales (Mohammed, 2016).

La interrupción de la señalización endocrina retrasa la reanudación de la ciclicidad ovárica postparto, una relación ampliamente reconocida como un factor importante en la insuficiencia reproductiva. El metabolismo materno o la nutrición afecta ovocitos y la calidad de los embriones. La salud metabólica durante el periodo de transición se asocia

con resultados dañinos en términos de anovulación o mortalidad embrionaria (Leroy, 2014). La nutrición es de relevante importancia, ya que interviene en la actuación reproductiva a través del estatus de la salud metabólica del animal, interviniendo en los procesos de señalización neuroendocrina, así como en la regulación hormonal (Leroy, 2014).

La hormona reguladora de gonadotropinas (GnRH) juega un papel central en la regulación de la competencia reproductiva en todos los vertebrados. Este decapeptido producido por unas cuantas células ubicadas en la parte anterior y media del hipotálamo es liberado en forma pulsátil hacia la hipófisis anterior, donde induce la liberación de las gonadotropinas: la hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Ojeda, 1979; Rodríguez, 2016). La GnRH es la primera en la jerarquía de hormonas que regulan los procesos reproductivos en los mamíferos. El entendimiento de los factores que regulan positiva o negativamente la expresión de la GnRH es de gran importancia para una óptima producción animal y para la reproducción de especies (Rodríguez, 2016). Por lo tanto es de vital importancia conocer los mecanismos que intervienen en el proceso de diferenciación sexual hipotalámica y la relación que presenta con la actividad del (SNC), con la finalidad de identificar los trastornos que intervienen en la reproducción.

Durante el desarrollo del cerebro, las hormonas sexuales tienen efectos organizacionales que conducen a diferencias permanentes entre los diferentes sexos en distintas regiones del cerebro, este es exquisitamente sensible a esteroides testiculares y  $T_4$  endógena, esta juega un papel importante en el desarrollo normal del cerebro masculino y femenino. En otros estudios se ha reportado que las hormonas esteroides de origen gonadal influyen en el desarrollo del cerebro adolescente y ambos organizan y activan circuitos neurales que juegan un papel en las conductas sociales (Velíšková, 2009; Yang & Shah, 2014; Mohammed, 2016; Zilkha, 2017).

La rata, después del ratón, es el animal de experimentación más utilizado en investigaciones biomédicas, especialmente en fisiología, toxicología, farmacología, comportamiento, inmunología y oncología. Esto se ve apoyado por el hecho de que algunas líneas de rata de laboratorio presentan una susceptibilidad específica para ciertas enfermedades complejas como la obesidad o el cáncer. Su mayor tamaño permite realizar ciertos protocolos que son muy difíciles de llevar a cabo en el ratón. Por ejemplo, con el desarrollo de las técnicas de microcirugía, y desde la existencia de líneas definidas (con un detallado conocimiento de sus parámetros inmunológicos), la rata de laboratorio se ha convertido, por lejos, en la especie más importante como modelo en trasplantes de órganos. Hasta la década de 1980, el uso de la rata en estudios genéticos se vio empobrecido por el poco desarrollo de su mapa genético y la baja disponibilidad de líneas genéticamente definidas (Guénet et al., 2003).

## **Diferenciación sexual**

La reproducción sexual asegura la continuidad de las especies y uno de los factores que presentan mayor relevancia en términos reproductivos es la determinación del sexo de los individuos, lo cual comienza al momento de la fertilización, seguido de la diferenciación gonadal y culmina con un evento fundamental que es la diferenciación sexual del cerebro. En este último proceso, se delimitan las diferencias estructurales y funcionales correspondientes de cada sexo, fenómeno que se conoce como dimorfismo sexual (Dorner, 1981; Herrera *et al.*, 2005). Las diferencias morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y de comportamiento entre machos y hembras se denominan, en su



conjunto, dimorfismo sexual; estas diferencias se deben a los cambios en algunos núcleos o circuitos cerebrales durante la etapa organizacional (Herrera, 2013).

El dimorfismo sexual en el cerebro puede encontrarse a nivel de morfología, conectividad de circuitos neuronales y expresión molecular (Yang & Shah, 2014; Werling, 2016; Zilkha, 2017). Un ejemplo interesante del dimorfismo en la conectividad de circuitos cerebrales se encuentra en *Drosophila*, se ha identificado un circuito neural específico para el macho, incluyendo neuronas sensoriales, centrales y motrices que controlan el comportamiento del cortejo masculino (Dorner, 1981; von Philipsborn, 2014; Zilkha, 2017). El dimorfismo sexual morfológico también se describió en estudios humanos post mortem, como el núcleo sexualmente dimórfico en el hipotálamo, que se ha relacionado con el comportamiento sexual y la orientación sexual (Swaab & Bao, 2013; Zilkha, 2017).

Existen evidencias que sustentan la teoría de que la diferenciación sexual es más activa en el fenotipo femenino, sin embargo, es probable que ambos sexos sean susceptibles a ciertos efectores característicos. En los mamíferos, tanto en machos como en hembras la diferenciación sexual del cerebro es consecuencia de diferencias en la expresión del genoma neuronal que a su vez está regulada por esteroides gonadales en etapas críticas del desarrollo perinatal (Yonehara *et al.*, 2003). Algunas funciones fisiológicas y de salud en los individuos adultos, son establecidos durante la etapa prenatal: alteraciones en el desarrollo materno pueden dirigir cambios en los adultos, incluyendo susceptibilidad a enfermedades (Dobbs, 2014).

El dimorfismo sexual ha evolucionado en los mamíferos para asegurar con éxito los sucesos reproductivos en los individuos (Mc Pherson, 2012). Los estudios genéticos en ratas son indispensables, así como en investigaciones preclínicas; en ratas el dimorfismo sexual es extenso, ya que se encuentran implicados más de 1000 genes en la expresión dimórfica (Shader, 2017). Phoenix *et al.* (1959), propusieron que el estradiol ( $E_2$ ) puede actuar fundamentalmente en dos formas diferentes: primero en una etapa "organizacional" durante el periodo prenatal y postnatal temprano, y en una etapa "activacional" en la edad adulta. El efecto organizacional del  $E_2$  conduce a la diferenciación sexual del hipotálamo y regula activamente los circuitos neuronales sexualmente dimórficos (Simerly, 2002; Schwarz, 2008; McCarthy, 2011; Herrera, 2013).

La red neuronal hipotalámica-límbica, se desarrolla de manera sexualmente dimórfica. Este complejo circuito es organizado de una manera específica, dependiente del sexo, los cuales responden a hormonas esteroides durante el periodo crítico del desarrollo. Los cambios en el sistema nervioso durante el periodo crítico alteran también el correcto funcionamiento durante una etapa tardía (Walker, 2011). Durante el desarrollo, el cerebro de los machos está expuesto a altos niveles de  $T_4$  de origen testicular que incrementan al final de la gestación y aproximadamente a las 2 h de nacidos; en contraste, la circulación de  $T_4$  es consistentemente baja en ratas hembras perinatales. Las hormonas esteroides tienen origen gonadal, se secretan a partir de los ovarios en hembras, durante el parto las hormonas femeninas tienen un papel neuroprotector al nacimiento, relacionados a trauma y anoxia (Koppel, 2014). En machos, los principales esteroides circulantes son esteroides androgénicos ( $T_4$  y dihidrotestosterona), (Reddy, 2013; Taubøll, 2015).

En ratas recién nacidas, los niveles de  $E_2$  son relativamente bajos, pero en el macho son elevados debido a la aromatización de  $T_4$  en neuronas de la periferia. Las (Alfa-fetoproteína), AFP circulantes en el feto, se unen de manera específica al  $E_2$  y en el caso del cerebro de las hembras, éstas lo protegen del efecto masculinizante del  $E_2$

(McCarthy, 2011), de esta manera se asume que los altos niveles de estrógenos plasmáticos presentes en la rata recién nacida se encuentran secuestrados por su unión a estas proteínas fijadoras de estrógenos. Por el contrario, en el macho concentraciones bajas de T<sub>4</sub>, pueden ser capaces de provocar la androgenización del hipotálamo (Herrera 2013; Genazzani, 2017). En machos, la T<sub>4</sub> circulante es importante para la activación de los órganos reproductivos, pero también es importante para la masculinización primaria del cerebro a través de la conversión a E<sub>2</sub>, catalizada por la enzima p-450 aromatasas (Walker, 2011; Juntti, 2010).

En este proceso, se delimitan diferencias estructurales y funcionales a nivel del (SNC), tanto morfológicas, anatómicas, fisiológicas, bioquímicas, genéticas, como del desarrollo cognitivo y conductual de los individuos (Werling, 2016; Shader, 2017; Genazzani, 2017). Es por ello que existe una relación muy estrecha entre el fenotipo en el desarrollo sexual y la presencia o ausencia de hormonas esteroides, ya que el tipo de secreción hormonal delimita las congruencias entre la genética, el fenotipo y el comportamiento sexual del individuo; además una disrupción de la fisiología reproductiva con los niveles hormonales durante el periodo crítico de la diferenciación sexual del cerebro trae repercusiones funcionales del cerebro en la edad adulta (Genazzani, 2017).

El dimorfismo sexual vinculado a la vida temprana ha sido descrito en consecuencias patológicas y se asocia a respuestas en la susceptibilidad y ocurrencia de crisis convulsivas en la edad adulta (Desgent, 2012). Las hormonas esteroides juegan un papel clave en el control neuroendocrino de la excitabilidad neuronal y la de susceptibilidad a crisis convulsivas (Reddy, 2010, 2013; Taubøll, 2015). El sistema límbico parece ser más vulnerable, este se desarrolla durante el periodo fetal en roedores y primates. El sistema límbico, el cual incluye el hipocampo, la amígdala y el cortex cingulado anterior, se forman durante la gestación, mientras que el giro dentado continúa su desarrollo durante la etapa post natal (Jones; 2014).

## **Estructuras del sistema nervioso que intervienen en el dimorfismo sexual**

Circuitos neurales dimórficos que intervienen en las conductas sexuales

Hay varios circuitos neurales que intervienen en el proceso del dimorfismo sexual, dentro de ellos se encuentran involucradas estructuras que intervienen tanto en las conductas como en la regulación neuroendocrina que interviene en la reproducción, dentro de éstas, se encuentran diferencias en el núcleo de la cama de la estría terminal (BNST), el núcleo medial de la amígdala (MeA) y el hipotálamo ventromedial (VMH) (Yang, 2014). También participan las siguientes estructuras:

- **El núcleo dimórfico sexual** (Walker, 2011; Herrera, 2013).
- **Núcleo ventromedial del hipotálamo (NVM)** (Cohen, 1992; Herrera, 2005).
- **Parte ventrolateral del núcleo ventromedial (VL-VNM)** (Matsumoto, 1997; Herrera, 2005).
- **Núcleo arcuato hipotalámico (ARCN)** (Matsumoto, 1997; Gorski, 1985).
- **Núcleo supraquiasmático (NSQ)** (Gorski, 1985).

- **Área preóptica (POA)** (Döhler, 1984; Lenz, 2012).
- **Amígdala** (Herrera, 2005).
- **Estría terminal (ST)** (Herrera, 2005).
- **Núcleo anteroventral periventricular del Área preóptica** (Herrera, 2005).

## 1. Diferencias Genéticas

### Efectos genéticos en la diferenciación sexual

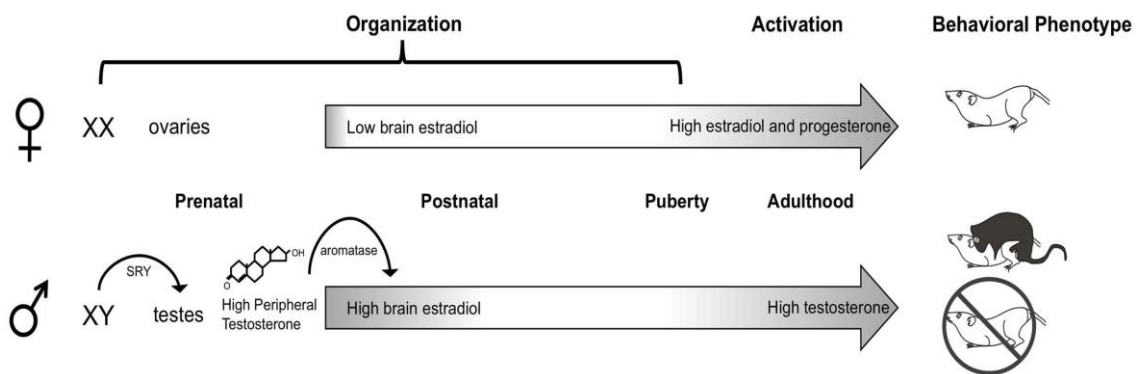


Figura 1. La organización neonatal cerebral y el comportamiento (Lenz, 2012).

En roedores machos, el gen SRY, en el cromosoma Y conduce al desarrollo de los testículos, en los cuales comienza la síntesis de andrógenos prenatales. Las concentraciones de  $T_4$  en plasma aumentan rápidamente durante el periodo embrionario y se presenta un pico corto después del nacimiento. Una vez en el cerebro, la  $T_4$  se convierte por la enzima P450 aromatasa en  $E_2$ , el cual actúa para masculinizar y feminizar el cerebro. Un segundo periodo organizacional se ocurre prepuberalmente, cuando las hormonas esteroides comienzan a elevarse. En la edad adulta, el cerebro diferenciado se activa por las concentraciones altas de hormonas gonadales circulantes: los andrógenos en los machos y estrógenos y progestinas en las hembras, para producir diferencias en las conductas sexuales (Fig. 1) (Lenz, 2012; Yang, 2014; Shader, 2017; Panzica, 2016; Zilkha, 2017).

Principalmente hay que determinar si una diferencia sexual es ante todo programada por los cromosomas sexuales, hormonas gonadales o una interacción entre los dos (Yang, 2014; Shader, 2017). Las hormonas gonadales son las mayores inductoras de diferencias sexuales en áreas cerebrales reproductivas y de comportamientos (Ferrari, 2016), pero que otras diferencias sexuales, incluyendo diferencias como en agresión, nocicepción y desórdenes autoinmunes son conformados por el cromosoma sexual, más fuertemente que por las hormonas (Shader, 2017). Mientras muchas diferencias sexuales son reguladas durante el desarrollo, se incluyen algunos en el área preóptica (POA) (Yang, 2014;), los eventos del desarrollo en la diferenciación sexual ocurren independientemente de las gónadas (Budefeld, *et al.*, 2012; Lenz, 2012).

## **Diferencias Anatómicas y fisiológicas: mecanismos celulares mediadores de la diferenciación sexual de POA**

Los efectos conductuales que provoca la prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) son específicos de la masculinización de la conducta sexual, es confirmada en hembras por la falta de efecto de la conducta sexual femenina y comportamiento materno, ambos mediados o influenciados por el POA (Ferrari, 2016). Los efectos de PGE<sub>2</sub> sobre la masculinización de POA durante su desarrollo, las prostaglandinas en el POA y eminencia media inducen a una liberación de E<sub>2</sub> y facilitan la generación del pico de LH en mujeres adultas que conduce a la ovulación (Ojeda *et al.*, 1979; Rage *et al.*, 1997). En concreto, las prostaglandinas inducen una rápida retracción de procesos astrogliales que permiten que la GnRH sea liberada desde la terminal neurosecretoria a la eminencia media. La fuente de las prostaglandinas son los astrocitos (Clasadonte, *et al.*, 2011) y la microglía, que son residentes del cerebro inmunológico (Lenz, 2012). La microglía es activada neonatalmente y contribuye al neurodesarrollo y procesos mentales se sabe que están involucrados en la diferenciación, sexual (Toonen, 2016).

La microglía expresa ambas isoformas del receptor de estrógenos y responde a la regulación de E<sub>2</sub> por diversas citocinas (Toonen, 2016). El E<sub>2</sub> se propone como un regulador clave de la función glial en alguna enfermedad neurológica y otras lesiones, actúan citocinas, quimiocinas y otras moléculas de señalización en el cual interviene la glía, y a su vez determina si microglía y astrocitos tienen efectos neuroprotectores o neurotóxicos (Toonen, 2016). Los estrógenos también inhiben la señalización apoptótica microglial (Dimayuga, *et al.*, 2005), por lo tanto se sugiere que las hormonas esteroides pueden regular el número microglial en el desarrollo cerebral (Toonen, 2016). Asimismo, la microglía y citocinas contribuyen a las cascadas de señalización que intervienen en el proceso de apoptosis para producir diferencias sexuales en el número celular de POA (Lenz, 2012).

La proteína precursora beta amiloide (APP), también participa en la conducta sexual, es una molécula que induce la activación de la microglía cuando se presenta una enfermedad neurodegenerativa, se regula en POA de los ratones y muestra conductas de apareamiento persistente después de la castración (Larsson, 1964; Park, *et al.*, 2010), lo que sugiere que la producción de una conducta normal en macho, puede ser modulada por esta proteína.

## **Bases moleculares de diferenciación sexual del circuito neuronal**

Existe evidencia de que hay un incremento en la expresión de proteínas estructurales específicas y su RNAm en procesos de plasticidad neuronal como el crecimiento neuronal y formación de sinapsis (Herrera, 2013). Los cambios en la expresión de RNAm codifican componentes estructurales que pueden desencadenar mecanismos de la respuesta de la plasticidad de las neuronas. Los esteroides sexuales juegan un papel importante en la regulación de la expresión de proteínas estructurales y su RNAm en tejidos sensibles a esteroides sexuales (McCarthy, 2008; Herrera, 2013). La tubulina, el mayor componente de los microtúbulos, es una de las mayores proteínas del citoesqueleto en las neuronas del SNC (Connor, 2001; Herrera, 2013).

Se ha reportado que la cantidad de RNAm que codifica para tubulina aislada en hipotálamo POA en ratas neonatales es mayor en machos que en hembras (McCarthy, 2008; Lenz, 2010). Y que esta cantidad en hembras incrementa por la exposición neonatal a andrógenos o estrógenos (McCarthy, 2008; Lenz, 2010). Los estrógenos facilitan el efecto sobre la expresión de *tau*, una importante proteína asociada a

microtúbulos, en células disociadas en hipotálamo de ratas fetales. Los andrógenos y estrógenos inducen crecimiento neuronal (Herrera, 2013).

### **Diferencias conductuales**

En el macho: presenta el cortejo indicando la orientación del macho hacia la hembra, presentando el olfateo de la zona genital, persecución a lo largo de la caja de prueba o rodete y marcaje de territorio (Eagly, 2013). La monta se caracteriza por el contacto del cuerpo de la hembra con las extremidades anteriores del macho y finalmente, la intromisión consiste en la inserción del pene y eyaculación (Eagly, 2013).

En la hembra: presenta atracción por el macho, proceptividad (pequeños saltos llamados *karting doping*), y receptividad (cambios de coloración en la región genital). Así como también presenta movimientos rápidos de la cabeza y orejas, *ear wiggling* presentando la posición *de lordosis* (arqueamiento del lomo para facilitar la intromisión por parte del macho), así como también la producción de sustancias odoríferas (feromonas) (Eagly, 2013).

### **Periodo crítico**

Al conocer el efecto que pudieran tener los esteroides en el hipotálamo, sentó las bases del estudio de la diferenciación sexual del SNC. Entre las décadas de 1960 y 1970, gran número de trabajos permitieron definir el tiempo o periodo crítico en que el SNC es más susceptible al efecto de las hormonas esteroides para organizar el sustrato y la función del SNC, así también se dieron a conocer cuáles son los esteroides más efectivos y la forma en que las hormonas esteroides pueden actuar en el SNC.

Gorski y Warner (1965), confirmaron en sus estudios que los andrógenos testiculares, por medio de su principal metabolito, el E<sub>2</sub>, son responsables de controlar el desarrollo de la conducta copulatoria propia del macho (Christensen, 1977; Herrera, 2005). Dörner y Hinz (1967), encontraron que si la T<sub>4</sub> está presente en el macho durante el periodo crítico, ya sea proveniente de los testículos para el caso de un macho intacto o por la administración exógena a una hembra o macho castrado, estos animales podrían ser permanentemente masculinizados. El término masculinización se refiere a la capacidad de presentar características y patrones típicos del macho, como es la secreción tónica de gonadotropinas, conductas copulatorias (monta), marcaje de territorio, postura de micción, conducta social y de juego, actividad espontánea y la reacción a varios estímulos Sensoriales (Gorski, 1978; Herrera, 2005).

Se ha reportado que en ratas, el cerebro es muy sensible a los efectos organizacionales de los andrógenos, especialmente a la testosterona durante la primera semana de vida. En machos infantiles hay una liberación de testosterona que ocurre en el día 18-19 de gestación y otra liberación durante la primera hora después del nacimiento, ocasionando un periodo crítico del día de edad P0 al día P2 de edad. La testosterona y sus metabolitos activos, tales como el estradiol y la dihidrotestosterona, son factores importantes en la androgenización del cerebro y la respuesta a daños durante la vida temprana, así como a crisis convulsivas (Desgent, 2012).

La desfeminización es la pérdida del desarrollo de las características femeninas, como la tendencia a mostrar lordosis por la presencia del macho, la presentación de patrones

cíclicos de ovulación y de gonadotropinas. Los conceptos de masculinización y feminización se refieren al aumento de las características de determinado sexo. Tales conceptos indican la supresión de los atributos de hembra y de macho, respectivamente (Herrera, 2005).

### **Mecanismo de acción de Esteroides**

El modo principal de acción de las hormonas esteroides, es para unirse a receptores específicos de hormonas esteroides intracelulares, induciéndolos a dimerizarse y translocarse al núcleo, uniéndose a elementos de respuesta a hormonas en el Ácido desoxirribonucleico (ADN) para regular la transcripción de genes (Wilson, 2013; Yang, 2014; Romano, 2016). Cuando los esteroides se unen a sus receptores afines, se desacoplan de una variedad de moléculas, incluyendo las proteínas de choque térmico, así como co-activadores de vinculación y co-represores (Wilson, 2013; Yang, 2014). Los receptores de hormonas esteroides pueden regular la transcripción independiente de los elementos de respuesta hormonal y la unión directa en el ADN, por ejemplo, por complejos con otros factores de transcripción, como Fos (Romano, 2016).

Cuando las hormonas esteroides reclutan factores para el complejo de transcripción, incluyendo co-activadores y represores, que modulan la eficacia transcripcional de ambos receptores hormonales y otros factores de transcripción epigenéticos, tales como metilación, acetilación y fosforilación, las hormonas son dependientes de diferencias sexuales en la expresión de co-activadores en los receptores a esteroides durante el período crítico neonatal, las cuales establecen diferencias sexuales cerebrales (Wilson, 2013; Romano, 2016).

Los receptores de hormonas esteroides, particularmente los receptores de estrógeno, tienen un papel en la regulación de la fisiología de la célula e incluso de la transcripción de genes que es independiente del modelo clásico de acción a través de los elementos de respuesta hormonal. Existen múltiples isoformas del receptor de estrógenos alfa: receptor de estrógeno (ER $\alpha$ ), beta (ER $\beta$ ), y un tercer receptor, GPR-30, el cual se puede localizar, ya sea, en la membrana, citosol, o núcleo. Receptores de hormonas esteroides inician una variedad de cascadas de señalización a través de la activación directa de quinasas, proteasas, y otras moléculas (Wilson, 2013; Yang, 2014).

Muchos de estos efectos ocurren mucho más rápidamente que la clásica transcripción de genes mediadores de efectos que podrían ocurrir, tales como, el cambio de la fisiología celular en segundos, los receptores a esteroides transmembranales median algunos de estos efectos rápidos (Wilson, 2013; Yang, 2014; Romano, 2016).

Durante la diferenciación sexual cerebral, el número de neuronas es limitado y son susceptibles a la presencia de hormonas esteroides, las cuales después del nacimiento, pueden activar el programa de muerte por apoptosis. El efecto de los esteroides parece estar involucrado en la regulación de la cinética de las células neuronales y en la apoptosis de estas células (Cooke et al., 1998). Por lo tanto, durante el desarrollo cerebral existe una vulnerabilidad y una exquisita sensibilidad a las hormonas esteroides (Genazzani, 2017) que pueden provocar cambios en la labilidad del SNC; una forma de identificar estos cambios, es por medio de la inducción a crisis convulsivas por medio de modelos convulsivos.

## **Crisis convulsivas**

Se ha descrito que las alteraciones hormonales actúan a nivel cerebral provocando modificaciones tanto a nivel del (SNC), como en la función reproductiva, ya que hay una compleja interdependencia bidireccional entre las hormonas esteroides sexuales y las crisis convulsivas: las hormonas afectan las convulsiones, mientras que las crisis convulsivas afectan la regulación de las hormonas endocrinas reproductivas. Ambas hormonas, esteroides sexuales femeninos y masculinos influyen en la excitabilidad del cerebro (McHugh, 2008; Velíšková, 2009; Reddy, 2013, Taubøll, 2015).

Las convulsiones y descargas epilépticas también afectan a las hormonas sexuales esteroides. Hay conexiones anatómicas estrechas entre el sistema temporolímbico y el hipotálamo que controla el sistema endocrino. La actividad epiléptica, especialmente mediada a través de la amígdala, altera la función reproductiva, incluyendo la reducción de ciclicidad ovárica en las mujeres y la alteración en la liberación de hormonas esteroides en ambos géneros (Frye, 2014). Durante el desarrollo del cerebro, las hormonas sexuales tienen efectos organizacionales que conducen a diferencias permanentes entre hombres y mujeres en distintas regiones del cerebro (Velíšková, 2009; Reddy, 2013).

Las hormonas esteroides tienen un papel en la etiología, fisiopatología, y/o alguna relación con las crisis epilépticas. En algunas mujeres con epilepsia, se reducen las convulsiones cuando las concentraciones de esteroides son altas, tal como durante la fase lútea del embarazo. Los espasmos Infantiles (crisis convulsivas generalizadas se observan en el primer año de vida) pueden ser ocasionados por la falta de esteroides maternos. Estos trastornos convulsivos típicamente responden pobremente a los anticonvulsivantes convencionales, pero pueden ser controlados con progestágenos (McHugh, 2008; Velíšek, 2005). Las hormonas esteroides juegan un papel clave en el control neuroendocrino de la excitabilidad neuronal y la de susceptibilidad a crisis convulsivas (Reddy, 2013; Taubøll, 2015).

La naturaleza de la epilepsia puede cambiar en los primeros años de la adolescencia, con crisis convulsivas alteradas en forma, todo lo cual puede añadir a la incertidumbre de la epilepsia (Velískova, et al., 2006). Varios de los mecanismos de síntesis, liberación y degradación es regulada por diferentes vías neurales, entre ellas toma un papel importante la regulación hormonal (Reddy, 2013).

### **Papel de las hormonas en las crisis convulsivas**

Las hormonas sexuales, tales como andrógenos, estrógenos y progesterona, así como sus metabolitos, participan en el desarrollo, maduración y formación de redes neurales de varias estructuras cerebrales como el hipocampo, que a su vez desempeña un importante papel la fisiopatología de la epilepsia (Koppel, 2014). Ha sido documentado que las hormonas sexuales alteran el umbral, frecuencia y los síntomas de las crisis. Se ha demostrado que los estrógenos pueden incrementar la excitabilidad neuronal y la susceptibilidad a las crisis, sin embargo otros estudios han revelado que las progestinas tienen actividad anticonvulsivante en modelos animales y pueden también reducir su frecuencia (Hosseini, 2013).

## **Progesterona (P<sub>4</sub>)**

La P<sub>4</sub> es un anticonvulsivo endógeno con impacto sustancial en la susceptibilidad a las crisis (Reddy, 2013). Es una hormona atractiva para intervenciones profilácticas sobre el desarrollo de la epilepsia, debido a sus acciones moduladoras multifuncionales en el cerebro. La P<sub>4</sub> hace tiempo se sabe que tiene actividad anticonvulsiva en modelos animales (Frye, 2012; Reddy, et al., 2008, 2013) y en estudios clínicos (Bäckström, et al., 1976; Herzog, 2002; Reddy, 2011).

Las mujeres con epilepsia son propensas a sufrir convulsiones en respuesta a la disminución de los niveles de P<sub>4</sub> durante períodos perimenstruales (Reddy, 2009, 2013). Estudios anteriores han demostrado que la P<sub>4</sub> apoya al desarrollo normal de las neuronas, y que reduce el grado de daño cerebral después de una lesión traumática cerebral (LTC) (Cutler, 2005, 2007; Wright, 2008; Stein, 2013; Reddy 2011, 2012, 2013; Verrotti, 2015). Se ha observado en modelos animales que hay un efecto protector provocado por el aumento de los niveles circulantes de P<sub>4</sub> (Meffre, et al., 2007; Reddy, 2012, 2013). Un número de estudios adicionales han confirmado que la P<sub>4</sub> tiene efectos neuroprotectores reduciendo la susceptibilidad a LTC (Gibson, et al., 2008; Wright, 2008; Singh and Su, 2013; Reddy 2011, 2013).

Estudios clínicos han evaluado la P<sub>4</sub> como tratamiento para la lesión cerebral traumática moderada a grave (Wright, et al., 2008; Xiao, et al., 2008; Reddy, 2013). Estos estudios demostraron la eficacia de la P<sub>4</sub> en LTC, como neuroprotector. La P<sub>4</sub> es altamente eficaz en la reducción de la discapacidad y muerte en el LTC. La P<sub>4</sub> tiene propiedades neuroprotectoras en modelos agudos de isquemia, lesiones, accidentes cerebrovasculares, y la disfunción astrogliar (He, et al., 2004; Reddy, 2013), lo que sugiere sus efectos beneficiosos en lesiones cerebrales.

La P<sub>4</sub> tiene múltiples mecanismos moleculares y celulares relacionados con las crisis convulsivas, y por lo tanto puede ser un agente modificador de la enfermedad natural. Las acciones celulares de P<sub>4</sub> están mediadas por los receptores de P<sub>4</sub>, que se expresan en el hipotálamo, corteza cerebral, el hipocampo y áreas límbicas (Pantoja-Jiménez, 2016; Velísková, 2007; Verrotti, 2015). La P<sub>4</sub> es un precursor intermedio para la síntesis de neuroesteroides (Roof, 2000; Reddy, 2013).

## **Testosterona (T<sub>4</sub>)**

La T<sub>4</sub> es conocida por producir tanto efectos proconvulsivantes como anticonvulsivos, dependiendo del modelo animal y el tipo de convulsión (Reddy, 2008, 2013). Tanto los animales y los estudios clínicos muestran que la T<sub>4</sub> aumenta la actividad de las crisis convulsivas por el metabolismo de los estrógenos (Reddy, 2013). Los datos epidemiológicos indican que la aparición de crisis epilépticas focales y tónico-clónicas es 50% mayor en perros intactos que en los perros castrados. La T<sub>4</sub> y afines andrógenos tienen efectos protectores contra convulsiones inducidas por PTZ, el cual interacciona con el sitio de unión a PTX en el receptor GABA<sub>A</sub> bloqueando el canal de Cl<sup>-</sup> (Ramos, 2012; Frye, et al., 2010; Reddy 2013).

Por otra parte, los estudios en animales castrados han demostrado que la disminución de la T<sub>4</sub> se asocia con mayor incidencia de convulsiones y el reemplazo con T<sub>4</sub> atenúa las convulsiones (Reddy, 2017, Taubøll, 2015). Se demuestra que la T<sub>4</sub> tiene una modulación de la susceptibilidad a las crisis, ocurre a través de la conversión a neuroesteroides con acciones "anticonvulsivantes" y "proconvulsivantes", y por lo tanto, el efecto de la T<sub>4</sub> sobre la excitabilidad neuronal y la actividad convulsiva depende de



las cantidades de distintos metabolitos de  $T_4$  dentro del cerebro (Reddy, 2008, 2013; Taubøll, 2015).

A diferencia del  $E_2$ , que generalmente provoca convulsiones (Reddy, 2013; Taubøll, 2015), el androstenediol ha demostrado producir potentes efectos anticonvulsivos (Kaminski, *et al.*, 2004). La  $T_4$  puede tener un efecto bifásico sobre las crisis: proconvulsiva a dosis más altas y anticonvulsivo a dosis más bajas. Sin embargo, la  $T_4$  en sí no ha sido reportada para mejorar convulsiones clínicamente (Herzog, *et al.*, 2002; Reddy, 2013). Las reducciones de las convulsiones se observaron sólo cuando se le dio la  $T_4$  junto con un inhibidor de la síntesis de estrógenos (Herzog, *et al.* 2002; Reddy, 2013), la aromatasa es la enzima clave para la conversión de  $T_4$  en  $E_2$ , este es un esteroide neuroactivo que promueve convulsiones (Reddy, 2013).

## **Estrógenos**

Las hormonas esteroides (estrógenos,  $P_4$  y corticoesteroides), juegan un papel muy importante en la epilepsia. Los corticoesteroides producidos por el estrés incrementan la epilepsia. Los neuroesteroides mejoran la inhibición GABAérgica y funciona como potente anticonvulsivo regulando la excitabilidad neural del hipocampo (Bianchi, 2003; Reddy, 2010, 2013; Verrotti, 2015). Por otra parte, las hormonas esteroides pueden modificar, interrumpir o revertir el proceso epileptogénico, así como la pérdida de células, neuroinflamación, neurogénesis, astrogliosis, y el brote axonal (Bianchi, 2003; Reddy, 2013; Verrotti, 2015). Por lo tanto, menstrual, gonadal, y el estrés relacionados con la función o síntesis de los neurosteroides pueden alterar las crisis (Reddy, 2010, 2013; Verrotti, 2015).

Ratas hembras epilépticas muestran aumentos cíclicos de la actividad epileptiforme en registros de EEG que coinciden con su ciclo ovárico, atribuible a los estrógenos. Se sabe que el  $E_2$  desempeña un papel en la que intensifica las convulsiones en mujeres con epilepsia (Reddy, 2013). Las concentraciones de  $E_2$  en plasma, aumenta tanto durante la fase folicular y durante la formación del cuerpo lúteo durante el ciclo menstrual normal (Verrotti, 2015).

En humanos, la irregularidad menstrual en las edades de 18-22 años se asocian específicamente con un mayor riesgo de epilepsia, la menarquia temprana aumenta el riesgo de crisis convulsivas aisladas. El uso de anticonceptivos orales no están asociados con convulsiones aisladas o epilepsia (Velísková, 2007; Ledoux, 2009; Reddy, 2013).

## **Tamoxifen**

Es un fármaco modulador selectivo de estrógenos, se ha utilizado de forma terapéutica en todas las etapas del cáncer de mama (Fan, 2014). Siendo este, un antagonista estrogénico, interfiere con el desarrollo normal del núcleo dimórfico sexual del área preóptica anterior (SDN-POA), provocando una disminución en el volumen de esta estructura (Gorski, 1986). El desarrollo de este núcleo inicia durante la vida fetal temprana y depende en gran parte del desarrollo hormonal durante el periodo de diferenciación sexual.

## Diferencias del género en las crisis convulsivas

En las crisis convulsivas se muestran incidencias en la diferencia de sexos, progresión y severidad, así como también en las respuestas a terapias. La incidencia de la epilepsia es generalmente mayor en machos que en hembras. Sin embargo, los mecanismos subyacentes dependen de la diferenciación sexual de los circuitos neuronales específicos, las regiones del cerebro implicadas en el control de las crisis convulsivas, no están claras. Hay muchos factores que intervienen en la determinación del sexo y muestra diferencias en la susceptibilidad a las crisis, incluyendo la presencia de dimorfismo sexual en las estructuras cerebrales implicadas en la generación y control de las crisis, en la conectividad regional, la sensibilidad a los neurotransmisores, la distribución del receptor, y la dependencia del medio hormonal y sobre los cambios en las concentraciones de hormonas sexuales durante el tiempo de vida (Raisman, 1973; Reddy, 2013; Verrotti, 2015).

Durante el desarrollo del cerebro, las hormonas sexuales tienen efectos organizacionales que conducen a diferencias permanentes entre hombres y mujeres en distintas regiones del cerebro (Raisman, 1973; Velíšková, 2009; Reddy, 2013).

Las hormonas esteroides juegan un papel clave en el control neuroendocrino de la excitabilidad neuronal y la de susceptibilidad a crisis convulsivas (Reddy, 2010, 2013; Taubøll, 2015). Las hormonas esteroides tienen origen gonadal, se secretan a partir de los ovarios en hembras. En machos, los principales esteroides circulantes son esteroides androgénicos ( $T_4$  y dihidrotestosterona), (Reddy, 2013; Taubøll, 2015).

Las hormonas esteroides en el patrón reproductivo primario, son los estrógenos y la  $P_4$ , que se liberan durante el ciclo menstrual. La fase folicular temprana está asociada con niveles bajos de estrógenos y  $P_4$ . La síntesis y secreción de estrógenos y  $P_4$  de los ovarios están controladas principalmente por la GnRH y las gonadotropinas hipofisarias, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Cuando se acerca la ovulación, el nivel de estrógenos se eleva y desencadena la liberación de LH, la cual conduce a la ovulación (Reddy, 2013; Kettner, 2016).

Las hormonas esteroides podrían tener un papel en la etiología, fisiopatología, y/o alguna relación con las crisis epilépticas. En algunas mujeres con epilepsia, se reducen las convulsiones cuando las concentraciones de esteroides son altas, tal como durante la fase lútea del embarazo. Los espasmos Infantiles (crisis convulsivas generalizadas se observan en el primer año de vida) pueden ser ocasionados por la falta de esteroides maternos. Estos trastornos convulsivos típicamente responden pobremente a los anticonvulsivantes convencionales, pero pueden ser controlados con progestágenos (Kettner, 2016).

La naturaleza de la epilepsia puede cambiar en los primeros años de la adolescencia, con crisis convulsivas alteradas en forma, todo lo cual puede añadir a la incertidumbre de la epilepsia (Velíšková, et al., 2006). De hecho, los patrones en las crisis de algunos niños epilépticos, cambian a medida que llegan a la adolescencia, amplificando estas dificultades (Camfield, 2014).

Una característica fundamental del sistema nervioso es que produce actividad eléctrica y el registro de esta nos proporciona una ventana funcional única, que no comparte con otros métodos de estudio.

## Modelos convulsivantes

Durante las crisis convulsivas se presentan cambios complejos en la plasticidad del cerebro que, después de un evento precipitante, convierte un cerebro normal en un cerebro debilitado por convulsiones recurrentes (Pitkänen and Lukasiuk, 2009; Pitkänen et. al, 2011; Reddy, 2013). Los estudios de epilepsia experimental son realizados por tres razones: el descubrimiento de fármacos anti epilépticos, mecanismos de clarificación, identificación en la epilepsia e interrelaciones entre eventos y procesos principales que conduzcan a dicho trastorno neurológico (Ergul, 2015).

Los modelos experimentales buscar inducir dos procesos generales, uno por el cual se van presentando los cambios discretos que a la postre dan lugar a la presencia de crisis, hay modelos crónicos, y otro que induce crisis convulsivas agudas. El kindling químico es un modelo epileptógeno usado para la comprensión de procesos epileptógenos y para el estudio de moléculas que previenen este proceso (Ergul, 2015).

- Modelos agudos:
  - I. Crisis convulsivas por electroshock máximo (MES)
  - II. Pentilenetetrazol (PTZ) inducción de crisis convulsivas
- Modelos Crónicos:
  - I. MES (eléctrico) crisis convulsiva
  - II. PTZ (químico) crisis convulsiva (modelo crónico)

El kindling es un fenómeno que resulta de la intensidad progresiva de la actividad convulsiva debido a la administración repetitiva de estimuladores subconvulsivos eléctricos o químicos (Ergul, 2015).

## Electroencefalografía

El registro electroencefalográfico de la actividad eléctrica cerebral (EEG) constituye la herramienta primordial para evaluar señales cerebrales eléctricas intra e interictales, así como para realizar estudios de neurodiagnóstico en pacientes con crisis convulsivas y eventos paroxísmicos (Sakkalis, 2015).

Esta herramienta es de vital importancia en el diagnóstico y el tratamiento de las epilepsias, así como su empleo en otras patologías cerebrales (traumatismo craneoencefálico, infecciones, enfermedades vasculares, etc.), también tiene relevante utilidad en el seguimiento de enfermedades psiquiátricas y de los efectos de diferentes sustancias que afectan directamente al sistema nervioso, ya que afectan el EEG. La señal que se registra en el EEG es el voltaje que cambia constantemente en la amplitud, frecuencia y en fase. El EEG es el registro de los cambios temporales de los potenciales eléctricos generados por la actividad neuronal. La actividad eléctrica se registra como cambios constantes en el voltaje durante un lapso de tiempo. Por consecuencia, el rasgo más característico del EEG es la frecuencia de sus ondas.

Cuando se calcula el espectro de potencia del EEG, se obtiene una serie de números que representa los componentes de frecuencia, incluidos en la época original analizada. Una de las herramientas numéricas que se ha aplicado con más éxito al análisis computacional del EEG, es la representación de este en el dominio de la frecuencia por

medio de la transformada de Fourier (FT). Esta técnica se realiza ya que es la que mejor se ajusta a las características estadísticas de la señal que va a analizarse. Con la utilización de esta técnica se pueden relacionar instantáneamente los cambios de potencia en las bandas de frecuencia EEG (Fernández-Mas, 1998).

Las ratas no epilépticas exhiben espontáneamente actividad en las oscilaciones de 5-9 Hz.

Las ratas epilépticas desarrollan dos tipos de oscilaciones de 5-9 Hz: oscilaciones fisiológicas, durante periodos interictales y ausencia de oscilaciones que aparecen inmediatamente anteriores a las descargas espiga-onda se correlacionan con las crisis de ausencia (Sitnikova, 2015).

En ratas con somnolencia muestran disminución en la banda de 3.2-5.2 Hz en la zona frontal. Y un incremento de actividad en la banda de 12.6-15.6.

En el cortex parietal, se muestra una disminución de actividad en la banda de 5.2-6.2 Hz y un incremento de actividad en 12.4-17.2 Hz.

En animales con actividad epiléptica se presenta actividad en el rango de frecuencia 12-17 Hz (Sitnikova, 2015).

### **Modelo Pentilentetrazol (PTZ)**

Entre los modelos dependientes de un agente quimioconvulsivo la administración sistémica del antagonista de GABA<sub>A</sub>, Pentilentetrazol (PTZ), es bien conocida por inducir crisis generalizadas. En dosis pequeñas ha sido utilizado como un modelo de crisis de ausencia y en cantidades mayores es capaz de generar crisis convulsivas clónicas y tónico clónicas, así como estatus epiléptico; es además, junto con el modelo de Electroshock Máximo (MES), uno de los modelos más utilizados para valorar la eficacia de fármacos antiepilépticos (Luttjohann, 2009).

Aunque en el cerebro las sinapsis glutamatérgicas excitatorias representan una vasta mayoría, aquellas de tipo inhibitorio juegan un rol esencial previniendo un exceso de excitación o coordinando la actividad entre redes neuronales (Giorgi, 2014). En la mayoría de las neuronas del (SNC) los potenciales postsinápticos de tipo inhibitorio son generados por los neurotransmisores GABA y Glicina, siendo mediados en el caso del primero por el receptor GABA<sub>A</sub>, un receptor ionotrópico que abre directamente un canal iónico transmembranal permeable a Cl<sup>-</sup>, permitiendo su entrada a la neurona, hiperpolarizándola y volviéndola menos excitable. Por tanto la administración sistémica de un antagonista de dicho receptor, como el PTZ, actúa en última instancia impidiendo la entrada de Cl<sup>-</sup> a las neuronas, imposibilitando su hiperpolarización (Luttjohann, 2009).

El modelo químico con PTZ, el cual es un fármaco que disminuye la actividad GABAérgica en el sistema nervioso, es un antagonista no competitivo del receptor GABA<sub>A</sub> que al interactuar con el sitio de unión a picrotoxina provoca una disminución en la conductividad de los canales de Cl<sup>-</sup>, en consecuencia hay un aumento en la excitabilidad del sistema nervioso que permite recrear crisis epilépticas que pueden ser convulsivas o no convulsivas, dependiendo la dosificación (Ramos, 2012).

Luttjohann, Fabene y Luijtelaar (2009) buscando establecer una escala conductual que evaluara de manera precisa las crisis inducidas con PTZ, implementaron un protocolo

de administración del fármaco que les permitió observar distintas expresiones comportamentales y su correlato electrográfico ante una serie de inyecciones lo suficientemente espaciadas como para impedir que el animal experimental presentara una crisis inmediatamente o entrara en estatus epilepticus. El protocolo consistió en aplicar una dosis inicial de 20 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.) y dosis sucesivas cada 15 minutos de 10 mg/kg i.p.; de esta manera pudieron identificar once categorías comportamentales y agruparlas posteriormente en seis estadios conductuales indicadores de distintas intensidades de crisis, basándose en su distribución temporal, latencia y el patrón EEG asociado a cada una.

Las estructuras cerebrales implicadas durante el dimorfismo sexual, al recibir estímulos externos de hormonas esteroides, conduce a una alteración en las poblaciones neuronales que se encuentran en desarrollo, tales alteraciones provocan efectos consecuentes al desarrollo de dichas estructuras, alterando la susceptibilidad del sistema nervioso (Panzica, 2016; Shader, 2017; Zilkha, 2017; Yang, 2014).

## **GABA**

El aminoácido ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el mensajero químico (neurotransmisor) de tipo inhibitor más abundante en el (SNC), Su existencia en el tejido nervioso garantiza el equilibrio entre excitación e inhibición neuronal, un requisito fundamental en la función sensitiva, cognitiva y motora. Un descenso de la concentración de GABA, provoca convulsiones, y puede llegar a provocar la muerte.

El precursor predominante en la síntesis del GABA es la glucosa, la cual es metabolizada a glutamato por enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (el glutamato y la glutamina también pueden actuar como precursores). La enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), la cual se encuentra casi exclusivamente en las neuronas GABAérgicas, cataliza la conversión de glutamato a GABA. La enzima requiere un cofactor, fosfato de piridoxal, para su actividad. Como el fosfato de piridoxal deriva de la vitamina B<sub>6</sub>, una deficiencia de esta vitamina en la dieta puede conducir a una reducción en la síntesis del GABA. Una vez sintetizado el GABA, es transportado hacia las vesículas sinápticas a través del transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (*vesicular inhibitory amino acid transporter*, VIATT).

## **Receptores GABA**

Las sinapsis inhibitoras que emplea GABA como transmisor puede mostrar tres tipos de receptores postsinápticos, llamados GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. Los receptores GABA<sub>A</sub> es un receptor ionotrópico, mientras que los receptores GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub> son metabotrópicos (Purves, 2004). El receptor GABA<sub>A</sub>, es una Glucoproteína heteropentamérica de 275 kD que da forma al ionóforo Cl<sup>-</sup> y a una serie de sitios de fijación para el GABA y una serie de moléculas que regulan su actividad (Flórez, 2008).

Se han encontrado en diferentes estudios seis clases de subunidades polipeptídicas. La diversidad de receptores se genera principalmente por la variabilidad de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Acciones inhibitorias en los receptores GABA<sub>A</sub>, actúan como un antagonista no competitivo, provocando una reducción en la frecuencia de apertura del canal de Cl<sup>-</sup> (Reddy, 2013; Ergul, 2015). La activación del receptor GABA<sub>A</sub> por diversos ligandos conduce a una afluencia de iones cloruro y a una hiperpolarización de la membrana que amortigua la excitabilidad (Ergul, 2015).

La alopregnanolona y otros neuroesteroides relacionados estructuralmente actúan como moduladores alostéricos positivos y activadores directos de los receptores GABA<sub>A</sub> (Ergul, 2015). A bajas concentraciones, los neuroesteroides potencian corrientes de los receptores GABA<sub>A</sub>, mientras que a concentraciones más altas, activan directamente el receptor (Bianchi, 2003; Reddy and Rogawski, 2012).

Al igual que los barbitúricos, mejoran el neuroesteroide de los receptores GABA<sub>A</sub>, se produce a través de aumentos tanto en la frecuencia de apertura del canal y la duración de apertura del canal (Ramos, 2012; Luijtelaar, 2014). Todos los sitios de fijación para GABA, barbitúricos, corticosteroides y PTX se encuentran en el interior del dominio del poro del canal. Otro sitio, llamado el sitio de fijación de las benzodiazepinas, se ubica en el exterior del poro y modula la actividad del canal (Ramos, 2012).

Los receptores GABA<sub>B</sub> son metabotrópicos, también se encuentran ampliamente distribuidos en el encéfalo, acoplados a una proteína G (Ramos, 2012; Luijtelaar, 2014). También se han descrito receptores de tipo GABA<sub>C</sub>, que aunque son ionotrópicos, sus características estructurales y funcionales, son distintas al GABA<sub>A</sub> (Polenzani et al., 1991; Costa y Guidotti, 1996).

### **Recaptación y degradación de GABA**

El mecanismo de la eliminación de GABA es similar al del glutamato: tanto las neuronas como la glía contienen transportadores de alta afinidad para el GABA, denominados GAT (se han identificado varias formas de GAT). La mayor parte del GABA es convertido en succinato, el cual es metabolizado además en el ciclo de los ácidos tricarbónicos que media la síntesis del ATP celular. Las enzimas necesarias para esta degradación, la GABA transaminasa y la succínico semialdehído deshidrogenasa, son enzimas mitocondriales. La inhibición de la degradación del GABA eleva el contenido tisular del GABA y aumenta la actividad de las neuronas inhibitorias. También existen otras vías para la degradación del GABA (Frye, 2012).

Los neuroesteroides son altamente lipofílicos y pueden cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica, son sintetizados en los tejidos periféricos y se acumulan en el cerebro, dichos neuroesteroides están presentes en neuronas de muchas regiones del cerebro que son relevantes para epilepsias focales, incluyendo el hipocampo y corteza cerebral (Reddy, 2013). Siendo la alimentación con suplementos hormonales un factor que interviene en la alteración del desarrollo normal del SNC durante el periodo perinatal temprano.

- **Planteamiento del problema**

Los suplementos hormonales que interactúan con el sistema endocrino de los animales, traen como consecuencia una serie de trastornos que afectan la reproducción y la salud de los individuos involucrados a estos tratamientos. En la producción ganadera, se presenta un decremento en las tasas de fertilidad, siendo afectadas por la industrialización y el productivismo agrícola.

Por esto, es de gran importancia desarrollar investigaciones utilizando diferentes técnicas y herramientas para tener una clara visualización y comprensión acerca de los efectos hormonales que involucran alteraciones de carácter morfológico y fisiológico, así como la susceptibilidad del sistema nervioso en la interrupción de la diferenciación sexual hipotalámica. Para esto, es posible utilizar animales de experimentación como la rata, pues es uno de las especies más utilizado en investigaciones biomédicas, especialmente en fisiología, toxicología, farmacología, comportamiento, inmunología, oncología y reproducción.

Los resultados podrían ser extrapolables a especies ganaderas y concientizar la influencia de las dietas con suplementos hormonales en la salud del ganado que las consumen, así como las afecciones que tendrán en su reproducción.

- **Objetivo General**

Estudiar los efectos de Tamoxifen y Propionato de testosterona durante el periodo crítico del dimorfismo sexual hipotalámico sobre la actividad electroencefalográfica cortical y la susceptibilidad a crisis en diferentes etapas del desarrollo en ratas.

- **Objetivos Particulares**

1. Analizar los cambios electroencefalográficos en hembras y machos en condiciones control y con exposición al tratamiento hormonal durante los día 7 días y los periodos pre y post puberal.
2. Establecer los cambios en la actividad EEG por medio de un análisis espectral en hembras y machos en condiciones control y con exposición al tratamiento hormonal durante el día 7 días y los periodos pre y post puberal.
3. Observar el efecto del tratamiento hormonal en la susceptibilidad a crisis convulsivas generalizadas tónico-clónicas y status epilépticos inducidos con pentilentetrazol (PTZ) en el día 7 y los periodos pre y post puberal en hembras y machos y sus diferencias con animales control.

- **Hipótesis**

Al modificar el ambiente hormonal durante el periodo de diferenciación sexual con hormonas esteroides, inducirá cambios en la actividad EEG y en la susceptibilidad del sistema nervioso en crisis inducidas por PTZ en diferentes edades del desarrollo

## Metodología

Las ratas se obtuvieron de la Unidad de Producción Experimental de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Se utilizaron 30 individuos hembras de la línea *Wistar* adultas (madres) así como sus respectivas crías y se alojaron bajo condiciones habituales de bioterio con fotoperiodo de 12 horas.

### Manejo y selección de las madres

A los 90 días de edad se evaluó la capacidad reproductiva de las ratas, mediante el análisis del ciclo estral por citología vaginal diaria, durante al menos tres ciclos reproductivos. Las ratas que presentaron su ciclo estral con características normales, se colocaron con un macho con el fin de permitir el apareamiento y así esperar una primera gestación. La primera camada, nos permitió evaluar la capacidad reproductiva de las ratas seleccionadas y el comportamiento materno. De acuerdo a estas observaciones se seleccionaron sólo aquellas hembras que presentaron una apropiada cíclicidad estral, con gestación y camadas normales y que presentaron un comportamiento materno adecuado.

Dos semanas después del primer parto, se realizó nuevamente el seguimiento del ciclo estral y durante la fase de estro del tercer ciclo, las ratas se colocaron en una jaula con un macho durante 3 horas para permitir el apareamiento; una vez terminado este tiempo se verificó la presencia de espermatozoides, así como la aparición del tapón vaginal mediante citología vaginal, a partir de este momento se inició la cuenta de la gestación, con una duración aproximada de  $502 \pm 3$  horas.

### Manejo y tratamiento de las crías

Con el propósito de estudiar a las crías a tiempos muy cercanos al nacimiento, se llevó un control y una vigilancia constante de las madres. La hora del parto se registró como hora cero del nacimiento de cada una de las crías y realizó el sexado de toda la camada. Una hora después del nacimiento, se administró el tratamiento a las ratas, vía subcutánea en la zona dorsal (Tabla 1). El sitio de inyección se cubrió con vaselina.

SEXO	GRUPO	TRATAMIENTO	Sacrificio de los animales		
			7 días	Pre Puberal (120grs)	Post puberal (180-200 grs)
Hembras	Control (HC)	Ninguno			
	Vehículo (HV)	20 ml Aceite de vehiculo			
	Tratadas (HPT)	30 mg de Propionato de testosterona + 20 ml de vehículo			
Machos	Control (MC)	Ninguno			
	Vehículo (MV)	20 ml Aceite de vehiculo			
	Tratados (MTx)	200 mg de Tamoxifen + 20 ml de aceite de soya			

**Tabla 1.** Diseño experimental donde se muestra el sexo, grupo, tratamiento utilizado y tiempo de sacrificio de los animales.



## Actividad electroencefalográfica (EEG)

Para analizar la labilidad del sistema nervioso cuando recibe lesiones tempranas y que repercuten en todo su desarrollo, se usó el modelo de convulsiones como una herramienta para evaluar la conductividad eléctrica del sistema nervioso de estos animales.

Los animales se anestesiaron con Isoflurano (5% en O<sub>2</sub> para inducción y 2% para mantenimiento) (Desgent, 2012), y se colocó en un aparato estereotáxico, siguiendo las coordenadas para implantar los electrodos epidurales de manera bilateral en la corteza prefrontal (motora): anterior a Bregma 1.0 mm y lateral 2.0 mm; y corteza parietal posterior a bregma 2.8 mm y lateral 2.0 mm, bajo todo el conjunto se soldó a un conector macho y se fijó al cráneo con acrílico dental (Valdés-Cruz et al., 2012).

Se utilizó un polígrafo GRASS 78E, el registro se preamplificará y se filtrará de 1 a 300 Hz. Las señales serán digitalizadas *on-line* con una frecuencia de muestreo de 500 Hz utilizando un sistema de adquisición analógico-digital diseñado en el Laboratorio de Neurofisiología del Control y la Regulación del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” (Fernández-Mas et al., 1998; Valdés-Cruz et al., 2008).

La adquisición de datos consiste en la conversión de señales analógicas a series de números digitales compatibles con una computadora. Esta conversión se hace en el sitio del registro utilizando una computadora con un programa específico (ADQCH8). Los espectros de potencia se calculan a partir de esta serie de datos. La resolución del convertidor analógico digital (AD) es de 12 bits, lo que asegura un rango dinámico suficiente para adquirir el EEG sin pérdida de información (Fernández-Mas, 1998).

## Análisis del poder espectral

Se realizó un análisis *off-line* del poder espectral utilizando el método de Wavelets para analizar los cambios transitorios del EEG que no son observables a simple vista. Para ello, se elegirán registros EEG libre de artefactos. Por cada registro de EEG se tomaron ventanas de tiempo de 10 minutos de cada condición (pre y post-PTZ) y analizarán las bandas de frecuencia de 1-4 Hz, 5-7 Hz, 8-12 Hz, 13-15 Hz y 16-30 Hz (Valdés-Cruz et al., 2008; 2012).

Se aplicaron dosis subconvulsivas de PTZ (Luttjohann, 2009; Giuseppe et. al. 2013, Ergul, 2015), la primera fue de 20 mg/kg y posteriormente en intervalos de 15 minutos dosis de 10 mg/kg hasta alcanzar la primera crisis convulsiva generalizada (CCG), administrando dosis subsecuentes hasta llegar a status epilepticus (Luttjohann et al., 2009; Pantoja et al., 2014).

Los grupos experimentales que se realizaron son a partir de 7 días, pre y post puberales. Estas pruebas se realizaron en grupos de ratas hembras masculinizadas y machos feminizados a distintas edades.

Las variables que se analizaron fue el número de dosis de PTZ administradas, latencia a la presencia de espigas ictales, número de crisis convulsivas generalizadas y numero de dosis de PTZ en las que presentaron *status epilepticus* (Pantoja et al., 2014).

## **Sacrificio de los animales y obtención de muestras**

El sacrificio de los animales se realizó por dislocación cervical, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, para el sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres (CONEVET/CENEVAL. Guía para la Certificación en el Ejercicio Específico de la Medicina Veterinaria y Zootecnia en Ciencia de los Animales de Laboratorio. México, D.F., 2000).

## **Análisis estadístico**

Se realizaron comparaciones entre los diferentes tratamientos (Control, vehículo, tratamiento), en cada día en estudio. Para medir la labilidad se analizaron los grupos experimentales de 7 días, pre y postpuberales. Las comparaciones de los diferentes tratamientos para la morfología se realizaron en los diferentes grupos (7 días, pre y postpuberales), tomando en cuenta el número de dosis que se administraron hasta lograr el *estatus epilepticus* (SE), el número de crisis que presentó y la dosis a la cual se presentó la primera crisis convulsiva generalizada (CCG).

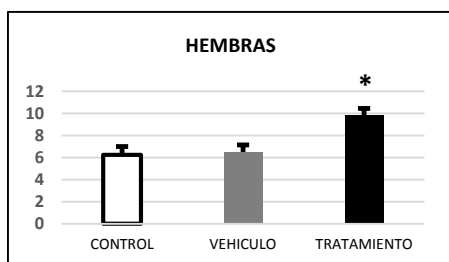
Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y prueba de homocedasticidad de Levene. Se realizó una prueba ANOVA comparando los diferentes tratamientos con una  $\alpha = 0.05$ ,

Se llevó a cabo el análisis electroencefalográfico de todas las bandas de la corteza fronto-parietal izquierda (Cx FP-Izq) y la corteza fronto-parietal derecha (Cx FP-Der). Se analizó la línea base, la dosis inicial y la última dosis, comparándolos entre los diferentes tratamientos, en épocas de un minuto durante cinco minutos. Se utilizó la prueba ANOVA de medidas repetida de tres factores: grupo, control, vehículo y tratamiento; condición, línea base, primer dosis de PTZ y última dosis de PTZ; y el tiempo como medida repetida. Utilizando la prueba de Dunnett como post hoc.

Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar. Las diferencias se consideraron significativas de  $p < 0.05$ . Los análisis se analizaron con el paquete estadístico SPSS 20 para Windows.

## Resultados 7 días de edad

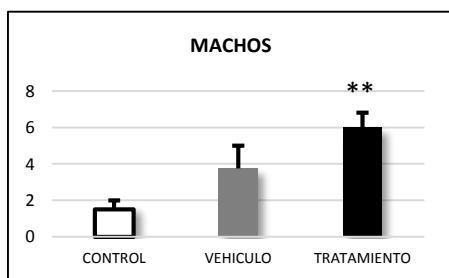
El número de dosis necesarias para presentar *status epilepticus* en machos y hembras fue modificado únicamente en hembras tratadas hormonalmente durante el periodo crítico.



\*  $p < 0.05$  Control y vehículo vs tratadas ANOVA seguida de la prueba de Dunnet.

**Figura 2. Media  $\pm$  e. e. m. número de dosis administradas hasta presentar *status epilepticus* con los diferentes tratamientos.**

El número de dosis necesarias para presentar la 1ª CGTS tuvo diferencia estadísticamente significativa en los machos tratados



\*\*  $p < 0.05$  Control vs tratadas ANOVA seguida de la prueba de Dunnet

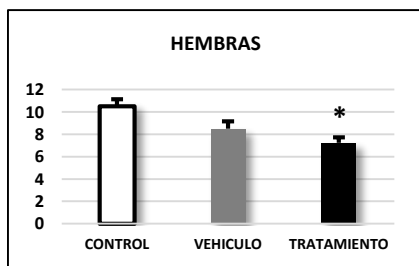
**Figura 3. Media  $\pm$  e. e. m. Número de dosis necesarias para presentar la 1ª CGTS con los diferentes tratamientos.**

Tomando en cuenta el número de dosis para lograr el *estatus epilepticus* se presentaron diferencias estadísticamente significativas en las hembras tratadas, requiriendo mayor dosis para presentar *estatus epilepticus* indicando que los mecanismos del desarrollo del SNC actúan de manera diferente en las hembras y los machos con los diferentes tratamientos que se administraron a la hora de nacidos; indicando que la interrupción hormonal durante el periodo crítico de diferenciación sexual juega un papel en la susceptibilidad del SNC, afectando áreas implicadas en la respuesta a las CGTS provocando un efecto protector en el cual se necesita aumentar el número de dosis para lograr provocar la primera CGTS, así como también se demuestra una diferencia de género en la respuesta a la administración de PTZ.

La dosis necesaria para provocar la primera crisis convulsiva incremento significativamente en machos tratados con respecto a los machos control, indicando un cambio en los mecanismos neurales que intervienen en la regulación de la actividad provocada por el PTZ, mientras que estos efectos no se notan significativamente en las hembras, indicando que la morfología y los mecanismos de acción son diferentes en las hembras y en los machos, indicando una diferencia de género en la susceptibilidad a las crisis convulsivas utilizando el modelo farmacológico del PTZ.

## Prepuberales

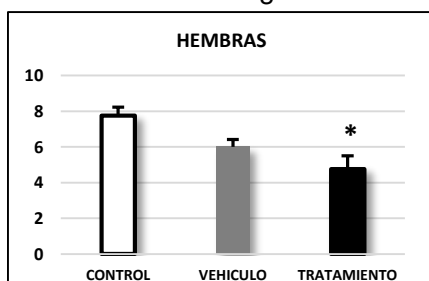
El número de dosis necesarias para presentar *status epilepticus* fue modificado únicamente en hembras tratadas hormonalmente durante el periodo crítico.



\*  $p < 0.05$  Control vs tratadas ANOVA seguida de la prueba de Dunnet.

**Figura 4. Media  $\pm$  e. e. m. Número de dosis administradas hasta presentar *status epilepticus* con los diferentes tratamientos.**

El número de dosis necesarias para presentar la 1ª CGTS tuvo diferencia estadísticamente significativa en las hembras tratadas



\*  $p < 0.05$  Control vs tratadas ANOVA seguida de la prueba de Dunnet

**Figura 5. Media  $\pm$  e. e. m. Número de dosis a la cual presento la primera crisis convulsiva generalizada con los diferentes tratamientos**

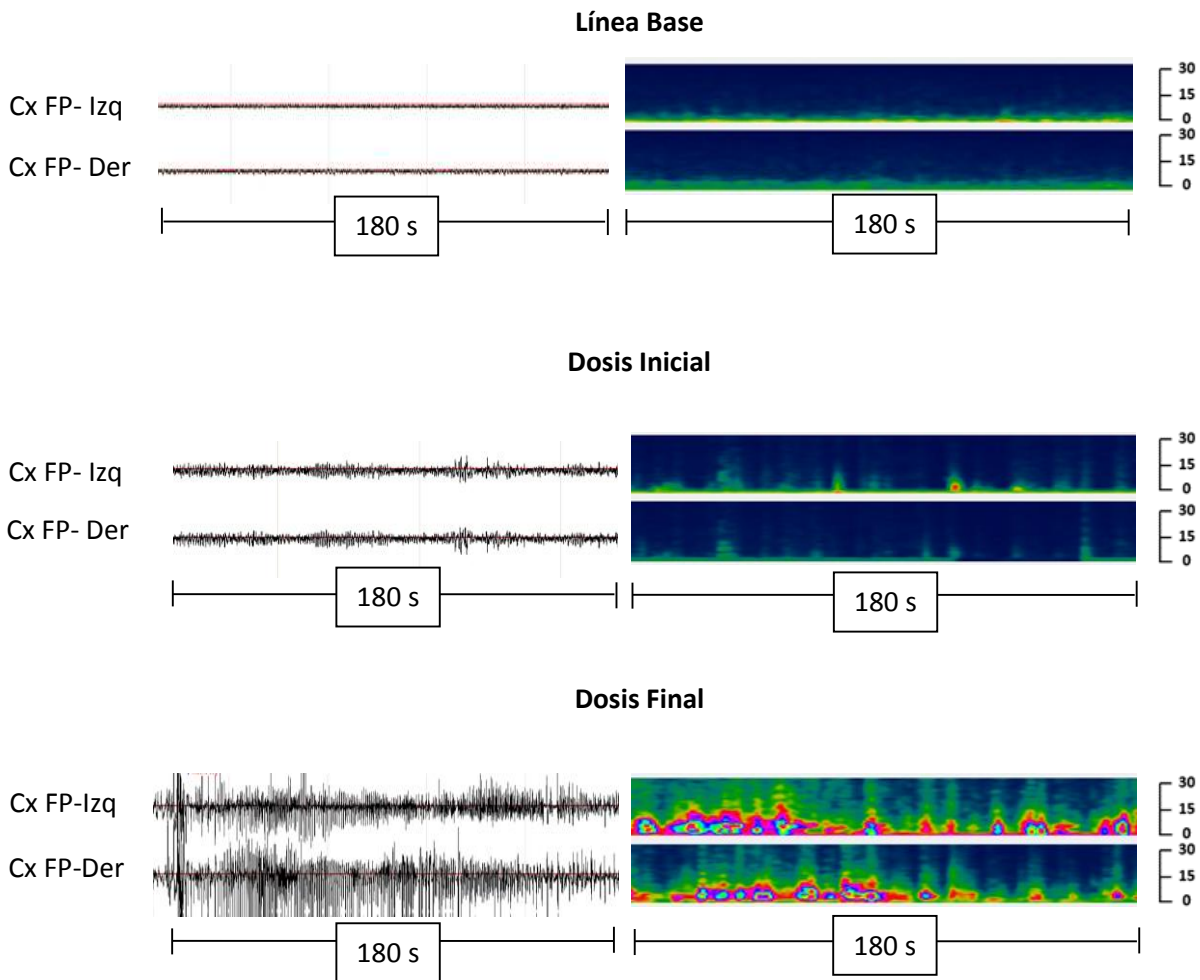
El número de dosis necesarias para llegar al *estatus epilepticus* es estadísticamente significativo en hembras, mostrando una disminución en el número de dosis necesarias.

En el número de las dosis necesarias para presentar la primera crisis convulsiva hubo una diferencia significativa en animales hembras expuestas al tratamiento, mientras que los machos no presentaron este comportamiento, indicando que en la edad prepuberal, las hembras presentan mecanismos neuroendocrinos que intervienen en la susceptibilidad del sistema nervioso al modelo farmacológico del PTZ, indicando que en esta etapa de crecimiento, en hembras se preparan los mecanismos neurales y hormonales que intervienen en el proceso de maduración para llegar a la etapa adulta.

## Postpuberales

A los 60 días de edad no se presentaron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los tres rubros tomados en cuenta para el análisis de resultados, indicando que a esta edad los mecanismos cerebrales que intervienen en la maduración para llegar a la etapa adulta, ya fueron realizados, por lo cual no se presentan cambios con ninguno de los diferentes tratamientos con respecto al grupo control.

## Actividad EEG en una rata tratada



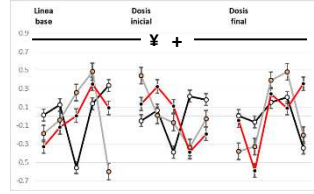
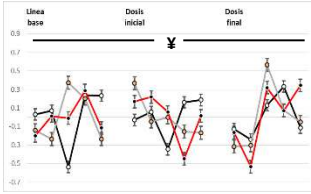
**Figura 6.** Trazo representativo de la actividad EEG en una rata tratada. A la derecha espectros de potencia representativos de 1 a 30 Hz con duración de 3 minutos, la potencia va de 0 a 30 Hz colores fríos a cálidos. Nótese el incremento de la potencia con la aplicación de PTZ.

## Poder espectral normalizado. Hembras 7 días

—○— Control    —●— Vehículo    —●— Tratamiento

13-15 Hz

16-30 Hz



Cx FP- Der

Figura 7. Comparación del poder espectral normalizado (media  $\pm$  error estándar), en las bandas de frecuencia 13-15 Hz, 16-30 Hz, en la corteza fronto-parietal izquierda (Cx FP-der), durante cinco minutos de línea base, dosis inicial y dosis final; así como su repercusión en las bandas de frecuencia. Nótese los cambios que hay entre grupos (Control, vehículo, tratadas), a través del tiempo, marcando las diferencias significativas ¥  $p < 0.05$ , tiempo/grupo, +  $p < 0.05$ , dosis/ grupo.

## Machos 7 días

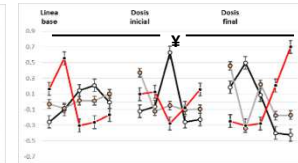
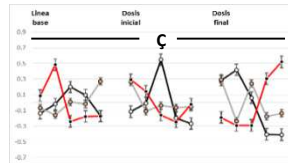
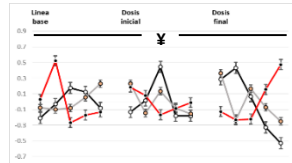
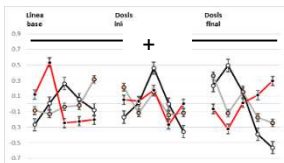
—○— Control    —●— Vehículo    —●— Tratamiento

5-7 Hz

8-12 Hz

13-15 Hz

16-30 Hz



Cx FP- Izq

Cx FP- Der

Figura 8. Comparación del poder espectral normalizado (media  $\pm$  error estándar), en las bandas de frecuencia de 5-7Hz, 8-12 Hz, 13-15 Hz, 16-30 Hz, en la corteza fronto-parietal derecha (Cx FP-der), y corteza fronto-parietal izquierda (Cx FP-izq), durante cinco minutos de línea base, dosis inicial y dosis final; así como su repercusión en las bandas de frecuencia. Nótese los cambios que hay entre grupos (Control, vehículo, tratadas), a través del tiempo, marcando las diferencias significativas ¥  $p < 0.05$ , tiempo/grupo, +  $p < 0.05$ , dosis/ grupo, Ç  $p < 0.05$ , tiempo/ grupo/ dosis.

## **Resultados EEG 7 días**

En hembras a los siete días de edad se mostraron diferencias significativas en la corteza fronto-parietal derecha (Cx FP- Der), en las bandas de 13-15 Hz y de 16-30 Hz, indicando una asimetría en la actividad cerebral, en la que muestra diferentes comportamientos con los diferentes tratamientos en distintas áreas cerebrales.

En los machos de la misma edad se presentaron diferencias significativas en las áreas analizadas con los diferentes tratamientos en las diferentes bandas de frecuencia, presentando estos cambios en la respuesta EEG desde la línea base en animales tratados, indicando una diferencia únicamente con el tratamiento, sin la administración de PTZ, estos resultados pueden asociarse con los resultados en las crisis, así como también nuestros resultados indican que hay cambios en las diferentes bandas de frecuencia en las áreas analizadas, mostrando que hay una diferencia en el comportamiento de la actividad cerebral en machos y en hembras, indicando que la respuesta a la inducción del modelo de PTZ es diferente en hembras y en machos a los siete días de edad; así como también la respuesta con los diferentes tratamientos, demostrando que la intervención hormonal a la hora de nacidas provoca alteraciones en las respuestas neuronales a los siete días de nacimiento, provocando cambios en la respuesta del perfil EEG con los diferentes tratamientos.

## Poder espectral normalizado. Hembras prepuberales

—○— Control    —○— Vehículo    —●— Tratamiento

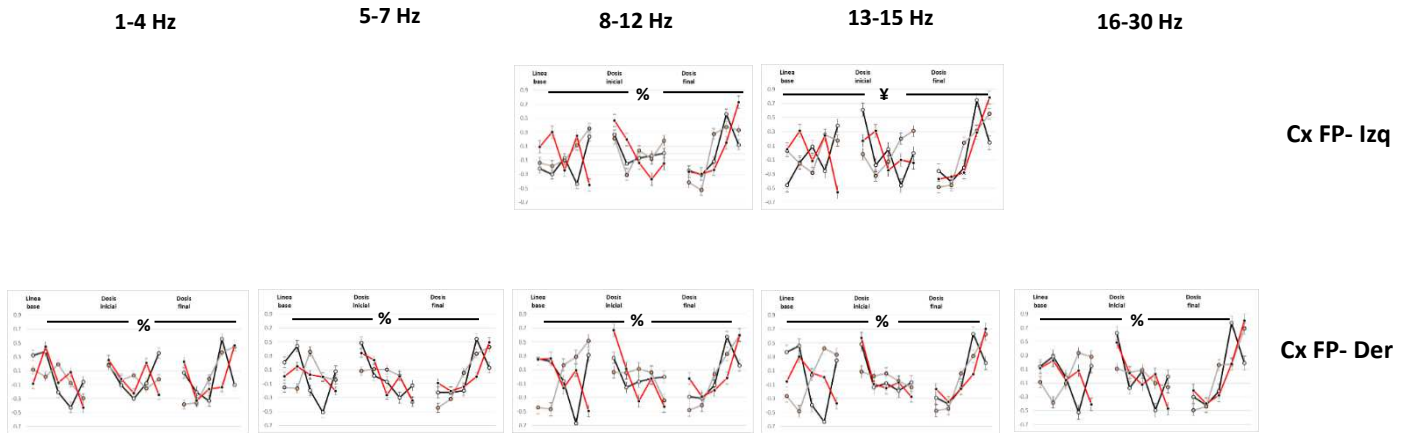


Figura 9. Comparación del poder espectral normalizado (media  $\pm$  error estándar), en las bandas de frecuencia de 1-4 Hz, 5-7Hz, 8-12 Hz, 13-15 Hz, 16-30 Hz, en la corteza fronto-parietal izquierda (Cx FP-izq), y corteza fronto-parietal derecha (Cx FP-der), durante cinco minutos de línea base, dosis inicial y dosis final; así como su repercusión en las bandas de frecuencia. Nótese los cambios que hay entre grupos (Control, vehículo, tratadas), a través del tiempo, marcando las diferencias significativas ¥  $p < 0.05$ , tiempo/grupo, %  $p < 0.05$ , dosis/ tiempo.

## Poder espectral normalizado. Machos prepuberales

—○— Control    —○— Vehículo    —●— Tratamiento

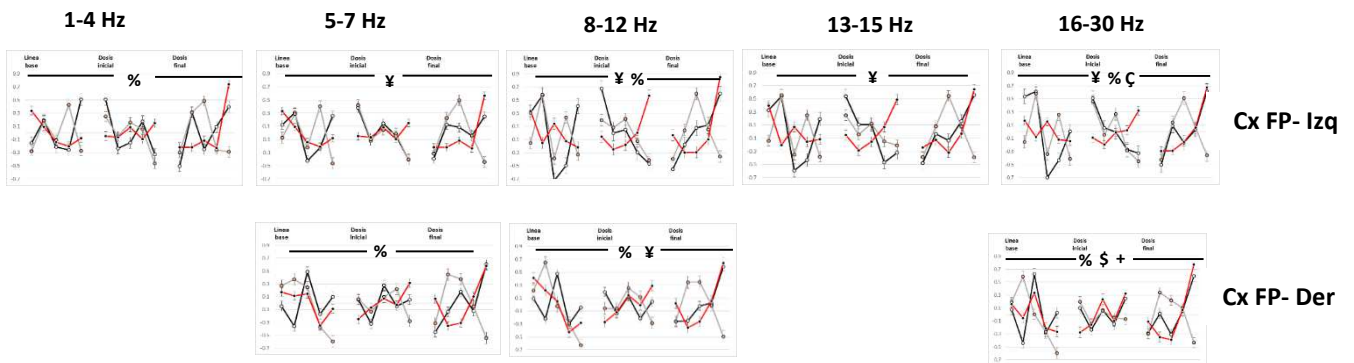


Figura 10. Comparación del poder espectral normalizado (media  $\pm$  error estándar), en las bandas de frecuencia de 1-4 Hz, 5-7Hz, 8-12 Hz, 13-15 Hz, 16-30 Hz, en la corteza fronto-parietal izquierda (Cx FP-izq), y corteza fronto-parietal derecha (Cx FP-der), durante cinco minutos de línea base, dosis inicial y dosis final; así como su repercusión en las bandas de frecuencia. Nótese los cambios que hay entre grupos (Control, vehículo, tratadas), a través del tiempo, marcando las diferencias significativas ¥  $p < 0.05$ , tiempo/grupo, %  $p < 0.05$ , dosis/ tiempo, Ç  $p < 0.05$ , tiempo/ grupo/ dosis, +  $p < 0.05$  grupo/ dosis.



## **Resultados EEG prepuberales**

En animales hembras prepuberales (30-59 días de edad), se mostraron diferencias significativas en la corteza fronto-parietal izquierda (Cx FP-Izq), en las bandas de frecuencia de 8-12 Hz y de 16-30 Hz, mientras que en la corteza fronto-parietal derecha (Cx FP-Der), mostro diferencias estadísticamente significativas en todas las bandas de frecuencia analizadas. Mostrando que la Cx FP-Izq presenta menores cambios significativos indicando que se comportan de manera similar con los diferentes tratamientos, mientras que la Cx FP-Der si muestra diferencia significativa en todas las bandas de frecuencia analizadas, indicando que el tratamiento hormonal a la hora de nacidas afecta tardíamente la actividad cerebral en diferentes regiones cerebrales.

En los machos se presentaron diferencias significativas en las regiones analizadas en las diferentes bandas de frecuencia en la Cx FP-Izq hubo diferencias significativas en todas las bandas de frecuencia, mientras que en la Cx FP-Der hubo cambios significativos en las bandas de 5-7 Hz, 8-12 Hz y de 16-30 Hz. Estos resultados muestran que hay una diferencia de género en la respuesta tardía (en la etapa prepuber), al tratamiento hormonal a la hora de nacidas, ya que presentan diferencias significativas tanto en las diferentes regiones analizadas, así como también en las diferentes bandas de frecuencia, indicando que el desarrollo cerebral es diferente en hembras y en machos ya que la respuesta al modelo farmacológico del PTZ afecta de diferente manera la respuesta a la actividad EEG.

## Poder espectral normalizado. Hembras postpuberales

—○— Control    —○— Vehículo    —●— Tratamiento

1-4 Hz

8-12 Hz

13-15 Hz

16-30 Hz

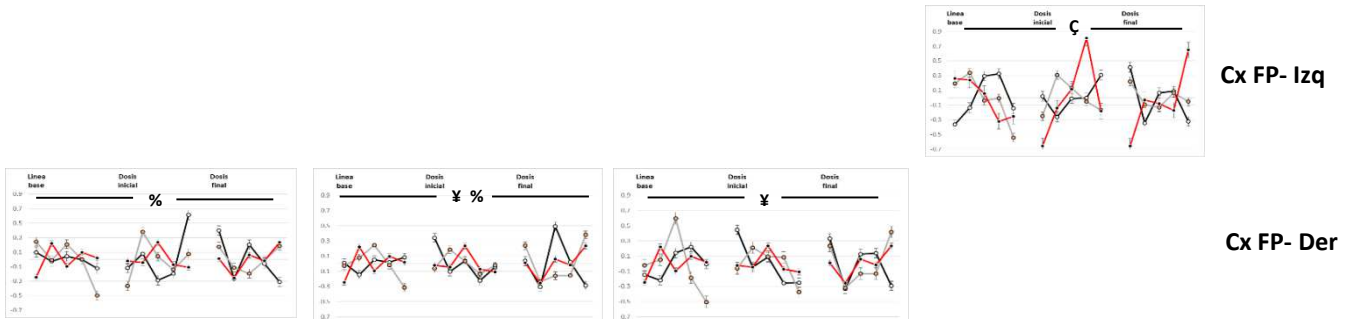


Figura 11. Comparación del poder espectral normalizado (media  $\pm$  error estándar), en las bandas de frecuencia de 1-4 Hz, 8-12 Hz, 13-15 Hz, 16-30 Hz, en la corteza fronto-parietal derecha (Cx FP-der), corteza fronto-parietal izquierda (Cx FP-izq) y corteza frontal bilateral (Cx F bilat), durante cinco minutos de línea base, dosis inicial y dosis final; así como su repercusión en las bandas de frecuencia. Nótese los cambios que hay entre grupos (Control, vehículo, tratadas), a través del tiempo, marcando las diferencias significativas, ¥  $p < 0.05$ , tiempo/grupo, %  $p < 0.05$ , dosis/ tiempo, Ç  $p < 0.05$ , tiempo/ grupo/ dosis.

## Poder espectral normalizado. Machos postpuberales

—○— Control    —○— Vehículo    —●— Tratamiento

5-7 Hz

8-12 Hz

13-15 Hz

16-30 Hz

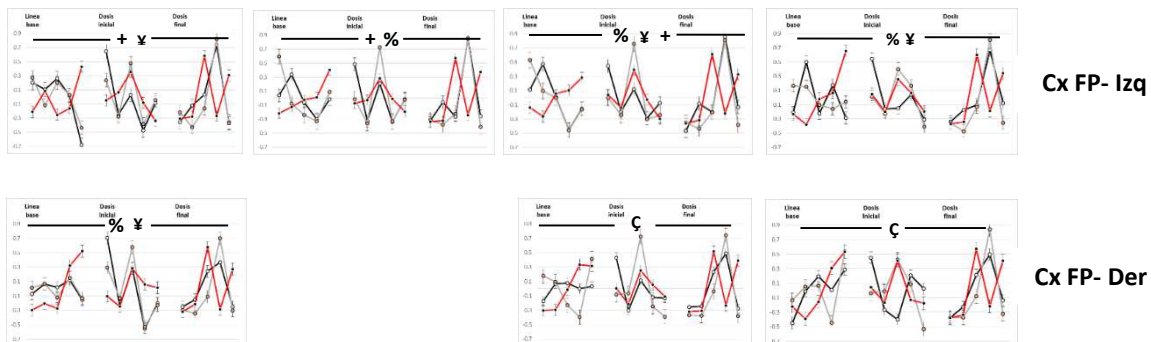


Figura 12. Comparación del poder espectral normalizado (media  $\pm$  error estándar), en las bandas de frecuencia de 5-7Hz, 8-12 Hz, 13-15 Hz, 16-30 Hz, en la corteza fronto-parietal derecha (Cx FP-der), corteza fronto-parietal izquierda (Cx FP-izq), corteza frontal bilateral (Cx F bilat), y corteza parietal bilateral (Cx P-bilat) durante cinco minutos de línea base, dosis inicial y dosis final; así como su repercusión en las bandas de frecuencia. Nótese los cambios que hay entre grupos (Control, vehículo, tratadas), a través del tiempo, marcando las diferencias significativas ¥  $p < 0.05$ , tiempo/grupo, %  $p < 0.05$ , dosis/ tiempo, +  $p < 0.05$  grupo/ dosis, Ç  $p < 0.05$ , tiempo/ grupo/ dosis.

## **Resultados EEG postpuberales**

En las hembras postpuberales se pueden notar cambios significativos en la Cx FP- Izq en la banda de 16-30 Hz, mientras que en la Cx FP- Der presenta diferencias significativas en las bandas de frecuencia de 8-12 Hz y de 13-15 Hz, indicando que a los 60 días de nacidas las hembras presentan cambios significativos en las respuestas al modelo farmacológico del PTZ en las diferentes regiones cerebrales a excepción de la Cx FP- Izq, indicando que el tratamiento hormonal a la hora de nacida no afecta el proceso del desarrollo de esta área durante el crecimiento y desarrollo de esta, mientras que las demás áreas muestran una alteración durante el desarrollo, indicando cambios en la respuesta al modelo experimental.

En los machos se presentan diferencias significativas en las áreas analizadas, mostrando diferentes respuestas en las diferentes bandas de frecuencia. En la Cx FP- Izq se muestran diferencias significativas en todas las bandas de frecuencia, con excepción de la banda de 1-4 Hz; en la Cx FP- Der presenta cambios significativos las bandas de frecuencia de 5-7 Hz, de 13-15 Hz y de 16-30 Hz; la Cx F- Bilat y la Cx P- Bilat presentan cambios significativos en las cinco bandas de frecuencia analizadas, indicando que las diferentes áreas cerebrales son afectadas de manera diferente cuando reciben el tratamiento hormonal a la hora de nacidas.

Existe también una diferencia de género en el desarrollo cerebral ya que el tratamiento hormonal a la hora de nacidas repercute en la respuesta al modelo farmacológico del PTZ en las diferentes áreas cerebrales en machos y en hembras, así como también muestra diferencias en las diferentes bandas de frecuencia que fueron afectadas, mostrando que hay cambios cerebrales en el desarrollo del sistema nervioso a través del tiempo, los cuales son afectados debido a la intervención que se tuvo con el tratamiento hormonal en el periodo crítico del dimorfismo sexual.

## Discusión

Este trabajo se diseñó para analizar qué efectos tiene la interrupción del periodo crítico del dimorfismo sexual sobre la susceptibilidad a las crisis convulsivas en neonatos. Nuestros resultados muestran que las hembras con interrupción hormonal en el periodo crítico de diferenciación sexual son menos susceptibles a presentar crisis a los siete días de nacidas, ya que se requirió un mayor número de dosis para presentar *status epilepticus*, mientras que los machos requirieron mayor número de dosis para presentar la 1<sup>o</sup> CCG, lo que nos puede sugerir que la forma de responder al modelo farmacológico del PTZ es diferente en hembras y en machos, mostrando diferencias estructurales involucradas en la presencia de CCG.

Los esteroides neuroactivos regulan cascadas de eventos en las enfermedades neurodegenerativas y procesos de señalización involucrados en muerte neuronal, actúan también como candidatos terapéuticos potenciales para interactuar en eventos neurodegenerativos en el SNC y sistema nervioso periférico (SNP) (Melcangi, 2010).

La diferenciación del tejido neural es influenciada en su desarrollo debido a las hormonas sexuales (Nacka, 2015; Melcangi, 2010), glucocorticoides y otras hormonas (Nacka, 2015), éstas contribuyen a la generación de redes neuronales dimórficas en el cerebro y en la médula espinal, este factor puede contribuir a la manifestación de daños al sistema nervioso (Nacka, 2015; Gur, 2004; Melcangi, 2010), así como disfunciones neurológicas progresivas (Nacka, 2015), afectando el desarrollo de patologías cerebrales (Gur, 2004; Melcangi, 2010; Nacka, 2015). Algunas patologías cerebrales pueden ser consecuencias de las diferencias morfológicas y funcionales en las estructuras neurales entre los sexos (Gur, 2004; Melcangi, 2010). A causa de la diferencia de sexos en la liberación hormonal, también muestra cambios en la respuesta en la manifestación de alteraciones fisiológicas y psiquiátricas (Melcangi, 2010).

Tales diferencias en el sexo debidas a concentraciones hormonales o en la producción de esteroides neuroactivos durante la vida adulta, puede tener consecuencias en la manifestación de alteraciones patológicas cerebrales, tales como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Huntington, esclerosis múltiple (Nacka, 2015), encefalomiелitis autoinmune (Nacka, 2015), esquizofrenia (Gur, 2004), accidente cerebrovascular, autismo, alteraciones del estado de ánimo tales como la ansiedad (Retuerto, 2017). La diferencia de sexos en las concentraciones o en la acción de esteroides neuroactivos como factores potenciales causados por la diferencia de sexos en patologías cerebrales y diferencia en la respuesta a tratamientos terapéuticos (Gur, 2004; Melcangi, 2010).

## Siete días de edad

Nuestros resultados muestran que las hembras con interrupción hormonal en el periodo crítico de diferenciación sexual son menos susceptibles a presentar CCG a los siete días de nacidas. Las hormonas sexuales pueden alterar el límite, frecuencia, así como también síntomas de las crisis convulsivas (Hosseini, 2013). Al inhibir el desarrollo cerebral mediante el tratamiento hormonal en el periodo crítico, demostró que en ratas machos infantiles son más sensibles a los cambios en el medio ambiente durante la vida posnatal a causa de que el desarrollo de su sistema inhibitor es diferente, comparado con las hembras (Desgent, 2012).

Los efectos de estrés prenatal sobre la plasticidad cerebral no son iguales en hembras y en machos (Melcangi, 2010). Las respuestas neurodegenerativas a insultos patológicos son modulados de manera diferencial en machos y hembras, debido a las hormonas sexuales (Nacka, 2015; Melcangi, 2010). Evidencias clínicas muestran que durante la infancia las crisis epilépticas afectan más a los niños que a las niñas. Sin embargo, la diferencia de sexos se relaciona con los patrones hormonales a diferentes edades, ya que se producen cambios en estos patrones, los cuales afectan directamente la intensidad y la frecuencia en las crisis epilépticas (Veliskova, 2013). En otro estudio utilizando el modelo de kindling en ratas adultas, muestran una forma dependiente del sexo, siendo los machos los más afectados (Desgent, 2012). Nuestros resultados parecen mostrar diferencias controversiales debido a que los machos requirieron mayor número de dosis para presentar la primera CCG; estas diferencias pueden ser explicadas por los modelos para generar excitabilidad cerebral y a la manipulación hormonal durante el periodo crítico del dimorfismo sexual.

Las evidencias preclínicas muestran que hay mayor daño cerebral en machos recién nacidos comparado con las hembras que sufren alguna lesión (Desgent, 2012). Por otra parte, se ha reportado que la testosterona cuando es aromatizada a estradiol ( $E_2$ ), presenta efectos proconvulsivos en algunos modelos animales disminuyendo el umbral de las crisis y mejorando la tasa de ocurrencia (Ledoux, 2009; Desgent, 2012). En el presente estudio observamos la disminución a la sensibilidad a las crisis convulsivas, efecto que puede ser explicado debido a la falta de  $E_2$  durante el periodo crítico del dimorfismo sexual (Gorski et al., 1985).

Los neuroesteroides están presentes en las neuronas principales de muchas regiones del cerebro que son relevantes para las epilepsias focales, incluyendo el hipocampo y la corteza cerebral (Saalman et al, 2007; Do Rego, et al, 2009; Reddy, 2013). Recientemente se ha descubierto mecanismos específicos del sexo que intervienen en la modulación sináptica del hipocampo, la cual es una estructura cerebral involucrada en las crisis convulsivas (Tabadatze, 2015; Huang and Wolley, 2012). La aplicación aguda de  $17\beta$ -estradiol en cortes de hipocampo, usándolos como modelo para acción de neuroesteroides en el cerebro, se encontró que el  $E_2$  inhibe la transmisión sináptica en minutos, teniendo efecto únicamente en mujeres, y sin efecto en los hombres (Tabadatze, 2015).

La cascada de señalización de los receptores GABA<sub>A</sub> indica que pueden ser modificados por la edad, el estrés y sensibilidad específica del sexo a las crisis convulsivas en el hipocampo, el cual se involucra el desarrollo normal del cerebro, respuestas al estrés en la vida temprana y epileptogénesis (Desgent, 2012). Nunez y Mc Carthy reportaron que usando agonistas a GABA<sub>A</sub> pueden inducir muerte de células hipocámpales en ratas recién nacidas, esos cambios son más severos en machos y pueden ser acentuados por el estradiol. Estos fenómenos pueden contribuir a la generación de hiperexcitabilidad y lesiones en el cerebro epiléptico (Ledoux, 2009; Nunez, 2008; Desgent, 2012).

Nuestros resultados coinciden con trabajos realizados, los cuales mencionan que las hormonas sexuales específicas del género afectan el límite de las crisis, así como la frecuencia, y cada uno de ellos juegan un rol importante en las diferencias de género y severidad de las crisis (Hosseini, 2013, Reddy, 2015, 2017). Estudios anteriores sugieren que los estrógenos y progesterona disminuye la susceptibilidad de las crisis en diferentes modelos experimentales (Hosseini, 2013).

### **Prepuber**

Nuestros resultados muestran que las hembras presentan una mayor susceptibilidad a las CCG en esta etapa, Hosseini en 2013, menciona que durante el desarrollo, el riesgo del progreso de epilepsia incrementa cuando el desarrollo cerebral se expone a más de un insulto en la vida temprana (Hosseini, 2013).

En el presente estudio observamos que las hembras tratadas hormonalmente presentan una mayor susceptibilidad a las CCG, Melcangi en 2010 demostró que las hembras jóvenes presentan menor daño que los machos jóvenes (Melcangi, 2010), nuestros resultados muestran que la interrupción hormonal durante el periodo crítico de diferenciación sexual afecta en una etapa tardía en la respuesta para presentar CCG; considerando la cerrada comunicación entre diferentes estructuras cerebrales, en las cuales interactúan con el hipotálamo e hipófisis, encargadas de la regulación de la secreción hormonal; afecta la producción normal de hormonas sexuales, esta producción también es alterada por crisis convulsivas; hay evidencia de que las crisis convulsivas afectan las concentraciones plasmáticas de hormonas sexuales, tanto en hembras, como en machos (Hosseini, 2013).

En ratas prepuber el eje HHG, es más sensible en el desarrollo del feto y juega un importante papel en la plasticidad sináptica la cual interviene en la susceptibilidad a las crisis convulsivas (Ebrahimi, 2014). Esta ventana de maduración podría servir como un periodo sensible a insultos en este modelo, sin embargo, Desgent en 2012 demuestra que los machos son más sensibles a los insultos posnatales con el desarrollo de crisis espontáneas tardías comparadas con las hembras, las cuales no son afectadas (Desgent, 2012). Sin embargo al contrario de nuestros resultados demostramos que las hembras tratadas requieren un menor número de dosis de PTZ para presentar *estatus epilepticus*, así como también requieren un menor número de dosis para presentar la primera CGTC. Por otra parte este mismo autor menciona que las hembras han mostrado neurogénesis después del kindling en células del giro dentado, los machos muestran una tendencia a un

efecto similar, sin embargo este no es significativo (Desgent, 2012), tales datos apoyan que las estructuras cerebrales que intervienen en el proceso de maduración en el periodo crítico del dimorfismo sexual juegan un papel en la susceptibilidad del SNC a presentar crisis convulsivas con el modelo del PTZ.

Seker en 2016 menciona que la etapa del embarazo es un periodo donde incrementa el ácido fólico, esta es una sustancia requerida en el incremento de la replicación celular y crecimiento de tejido celular fetal. Las ratas prenatales tratadas con ácido fólico presentan resistencia a presentar crisis convulsivas con el modelo de PTZ cuando estas llegan a la etapa prepuberal demostrando que en animales no tratados presentan un significativo incremento de fuga de PTZ a través de la barrera hemato–encefálica (Seker, 2016).

La exposición a estrés durante el periodo temprano de nacimiento provoca cambios dependientes de la edad en la susceptibilidad a las crisis convulsivas con el modelo PTZ durante la infancia y en el periodo prepuberal (Ebrahimi, 2014).

También ha demostrado que el estrés en la vida temprana resulta en cambios en la respuesta a crisis límbicas con un patrón dependiente del sexo, en el cual implican mecanismos importantes que intervienen en la vida temprana, los cuales promueven la vulnerabilidad a la epileptogénesis (Desgent, 2012).

Otra posible explicación al efecto protector que proporciona el grupo con manipulación hormonal con respecto al grupo control en hembras, es que, demostró que el estrés posnatal temprano, en este caso por manipulación en el periodo post natal temprano, confiere vulnerabilidad a la epileptogénesis límbica, mostrando una disminución en el umbral de las convulsiones en ratas tratadas hormonalmente durante el periodo crítico del dimorfismo sexual. Más recientemente se ha mostrado que las ratas expuestas a estrés en la vida temprana acelera las crisis convulsivas en la edad adulta (Salzberg et al., 2007).

## **Postpuber**

Los animales en esta edad no presentan cambios estadísticamente significativos, a pesar de lo reportado en trabajos anteriores, en etapas adultas.

Los cambios anormales en la etapa prenatal y posnatal que involucran experiencias estresoras, generalmente facilitan el desarrollo a las crisis convulsivas provocando una disminución del umbral en ratas adultas (Desgent, 2012).

Jones en 2016 menciona que el dimorfismo sexual se asocia con la susceptibilidad a las crisis convulsivas en adultos, las altas concentraciones de andrógenos actúan en el desarrollo del cerebro de los machos, las cuales pueden hacerlo de alguna manera “híper – reactivo”.

Las hormonas esteroides en el patrón reproductivo primario, son los estrógenos y la progesterona, que se liberan durante el ciclo menstrual. La fase folicular temprana está asociada con niveles bajos de estrógenos y progesterona. La síntesis y secreción de estrógenos y progesterona de los ovarios están controladas principalmente por la hormona

liberadora de gonadotropinas (GnRH) y las gonadotropinas hipofisarias, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Cuando se acerca la ovulación, el nivel de estrógenos se eleva y desencadena la liberación de LH, la cual conduce a la ovulación (Reddy, 2013).

### **Diferencias de género en la respuesta a las crisis convulsivas**

De acuerdo con nuestros resultados encontramos una diferencia de género en la respuesta a las crisis convulsivas mediante la administración del modelo farmacológico PTZ a los siete días de edad.

Se tiene evidencia que el cerebro es sexualmente dimórfico, se ha encontrado diferentes respuestas en redes neuronales que controlan las crisis convulsivas (Reddy, 2017; Giorgi et al., 2014). Durante el desarrollo del cerebro las hormonas sexuales dirigen permanentemente diferencias en distintas regiones cerebrales, las cuales juegan un papel específico en las características cerebrales (Meffre, 2007; Reddy, 2017; Shah, 2012).

Nuestros resultados muestran que a los siete días de nacidas y prepuberales, las diferencias de sexos en los efectos protectores debido a los neuroesteroides, los cuales pueden surgir de las variaciones entre hombres y mujeres, en los cuales se involucran factores tales como hormonas esteroides, actividad metabólica y diferencias biológicas en receptores neuronales o redes neuronales en el cerebro (Wu, 2013; Tabatadze, 2015).

De acuerdo con Reddy en 2017, menciona que las ratones y ratas hembra son más sensibles del SNC debido a acciones de la progesterona, que los machos (Reddy, 2017). Las hormonas esteroideas actúan en regiones discretas del cerebro femenino para regular conductas sexuales y otros aspectos de la reproducción a través de acciones genómicas clásicas, las cuales son mediadas por receptores esteroideos, y estos se encuentran presentes en varias regiones cerebrales, es posible que la diferencia en la distribución de hormonas esteroides pueden contar como diferencias sexuales involucradas en la susceptibilidad a las crisis. Los neuroesteroides tienen influencia sobre las conductas, así como cambios en la excitabilidad en los cuales se encuentra involucrados cambios en la expresión de los receptores GABA<sub>A</sub>. Las fluctuaciones de progesterona y progesterona derivada de neuroesteroides durante el ciclo menstrual alteran los receptores mediadores de GABA<sub>A</sub> provocando una inhibición tónica (Reddy 2012, 2017).

Wu en 2013 demostró que el papel de la subunidad  $\delta$  extrasináptica de los receptores GABA<sub>A</sub> es un mediador crucial del ciclo estral, relacionado a los cambios en la excitabilidad neuronal y la susceptibilidad a crisis en ratones. La expresión de estos receptores actúan en diferentes subcampos del hipocampo, actúa en la inhibición tónica y en la susceptibilidad a las crisis (Wu, 2013; Reddy, 2017). Buscando determinar las diferencias sexuales en la expresión de los receptores  $\delta$ GABA<sub>A</sub>, así como el funcionamiento de este, sobre la sensibilidad a las crisis convulsivas y la actividad anticonvulsiva de los neuroesteroides, se demostró que la función protectora es similar en machos y en hembras (Reddy, 2017)



## Efectos sobre el EEG

Durante el desarrollo del cerebro, las hormonas sexuales tienen efectos organizacionales que conducen a diferencias permanentes entre machos y hembras en distintas regiones del cerebro (Velíšková, 2009; Reddy, 2015, 2017). Usando el EEG, se demuestra que las ratas hembras son más resistentes a la epileptogénesis (Desgent, 2012). Por lo cual al interrumpir el desarrollo normal durante el periodo crítico de diferenciación sexual con el tratamiento hormonal afecta más a las hembras en etapas tardías (7 días de edad y prepuberales).

Poco es lo que se sabe de la ontogénesis temprana y su comunicación funcional en redes neuronales humanas (Koolen, 2016). Recientes estudios anatómicos han revelado el desarrollo microscópico de redes estructurales en el feto humano, se ha encontrado que la dinámica neuronal temprana puede surgir durante la mitad tardía de la gestación. Algunas características de larga escala de coordinación espacial en la actividad eléctrica del cerebro fue reportado en sueño en humanos recién nacidos (Omidvarnia, 2015; Koolen, 2016).

No hay reportes sobre diferencias espaciales en el desarrollo de sincronía entre áreas corticales, todavía se realizan estudios histológicos que establezcan diferentes trayectorias involucradas en el desarrollo del crecimiento de largo alcance cortico – cortical. Analizando el EEG, demostró que la sincronía entre activaciones corticales, se correlacionan fuertemente con el desarrollo durante los dos últimos meses antes del nacimiento normal del humano. Los cambios en el perfil EEG demuestra que al intervenir con algún agente durante el desarrollo cerebral, muestra cambios en la maduración histológica, los cuales corresponden con el funcionamiento en las conexiones de redes neurales (Koolen, 2016). Shany y colaboradores., en 2014 demostró que la maduración cerebral temprana puede diferir entre infantes que normalmente se desarrollan en el útero vs. Aquellos que nacen prematuramente y experimentan un desarrollo ex útero más largo (Shany, 2014).

Nuestros resultados muestran que los animales de 7 días de edad en hembras presentó una asimetría en las bandas de 13-15 Hz y de 16-30 Hz presentando cambios estadísticamente significativos en la corteza fronto-parietal derecha, mientras que en la corteza fronto-parietal izquierda no presento diferencias significativas. Coincidiendo con Koolen, 2016, el cual demostró la comparación de los hemisferios presentando una asimetría significativa del hemisferio izquierdo un índice de activación sincrónica más alta que el hemisferio derecho en infantes (Koolen, 2016). Estudios anteriores muestran que la lateralización hemisférica estructural comienza su desarrollo en una etapa temprana (Behrmann, 2015).

Acorde con nuestros resultados, mencionan en trabajos anteriores realizados los cambios clínicos surgen desde que se presentan cambios en el desarrollo de redes en el SNC durante la infancia temprana, la cual puede llevar a la desaparición de signos neurológicos anormales presentes en el neonato o a la aparición de un déficit neurológico más adelante debido a la creciente complejidad de las funciones neuromotoras (Nevalainen, 2015). Este déficit se muestra en el presente trabajo en todas las etapas analizadas (7 días, prepuberales y postpuberales), los cuales presentan cambios significativos entre sexos, así como también muestran asimetría de los hemisferios.

El conocimiento de neuropatologías acerca de encefalopatías relacionadas a la edad, sugieren una diversa combinación de alteraciones que afectan el desarrollo cerebral presentando un periodo de tiempo muy sensible. Lo cual muestra un problema en el funcionamiento de redes del SNC, las cuales se localizan en ciertas áreas cerebrales (Nevalainen, 2015). Esta es una de las razones de las dificultades que se presentan en el neurodesarrollo, afectando a varios infantes pretérmino no solo en un simple parámetro (Nevalainen, 2015).

En estudios realizados en animales con crecimiento fetal restringido han demostrado que estos pueden presentar una maduración cerebral, cortical y estructural más acelerada en comparación con los que presentan una edad gestacional apropiada (Cohen, 2018). Se muestra evidencia de que la hipoxia crónica, privación de nutrientes y estrés oxidativo, es asociado con el crecimiento fetal restringido, interfiriendo con el desarrollo normal y funcional de la corteza y tractos cortico-talámicos (Miller, 2016; Cohen, 2018). Hay factores de riesgo al nacer, tanto obstétricos como neonatales, tales como la corioamniosis y hemorragia intraventricular neonatal, las cuales han sido vinculadas con el retraso de la maduración EEG. Estos factores de riesgo son más prevalentes en el grupo de edad gestacional apropiada comparada con el grupo de crecimiento fetal restringido. La relación que se demostró en el EEG durante un desarrollo normal: la densidad cortical sináptica incrementa durante la infancia, este cambio es acompañado por un incremento en espesor cortical y poder absoluto delta (Li et al., 2015). El volumen del tálamo se encontró reducido en infantes con crecimiento fetal restringido. Esos cambios pueden influir en la actividad electrofisiológica resultando en alteraciones en el espectro de potencia del EEG. De hecho, la banda delta (0.5-4 Hz), es ampliamente vinculada a la densidad cortical sináptica (Cohen, 2018). Estos datos concuerdan con el presente trabajo en los machos de siete días de edad presentando diferencias significativas a través del tiempo (5 minutos), que se registró para su análisis. Mientras que las hembras no presentaron cambios significativos, indicando que la respuesta al medir el EEG es diferente en esta banda (delta), mostrando una diferencia de género.

En el presente trabajo en ratas prepuberales, presentan cambios significativos en la banda delta (0.5-4 Hz), las hembras en la Cx FP-Der, mientras que en la Cx FP-lzq no presento cambios significativos en esta banda. Por el contrario de los machos; presento cambios significativos en esta banda, pero únicamente en la Cx FP-lzq y en la Cx FP-Der no presento cambios. Indicando una diferencia de género en dichos hemisferios. Buchmann en 2010 menciona que durante la adolescencia la poda sináptica reduce dramáticamente, la cual se refleja en una reducción en el espesor cortical mostrándose en la banda delta.

Se ha demostrado, que los efectos del crecimiento fetal restringido y la premaduración sobre la maduración funcional cerebral durante la infancia, mostraron que estos recién nacidos presentan en etapa de sueño los siguientes valores al análisis espectral: valores más bajos en la banda delta y significativamente alto la banda teta, alfa y beta comparados con recién nacidos de edad gestacional apropiada (Cohen, 2018). En el presente trabajo pudimos demostrar que en hembras a los siete días de edad solo presentan cambios significativos en la banda sigma y en la banda beta, pero únicamente en la CxFP-Der,

mientras que la CxFP-Izq no presenta cambios significativos. Mientras que los machos a esta edad presentan cambios significativos en todas las bandas analizadas en las dos regiones.

Mientras que al crecer, en ratas prepuber, se notan cambios durante el desarrollo de las redes neurales, y estos cambios se manifiestan en una etapa tardía, cuando se interrumpe hormonalmente el proceso de dimorfismo sexual en el periodo crítico; así como también indica que los mecanismos del desarrollo son diferentes en las hembras y en los machos ya que se comportan de manera diferente presentando asimetría en las áreas cerebrales analizadas, así como también un desarrollo diferente con respecto al sexo.

En ratas postpuber, a pesar de no presentar cambios en los parámetros evaluados (Número de dosis para presentar *status epilepticus*, número de crisis y número de dosis para presentar la 1<sup>º</sup> crisis convulsiva generalizada), en el estudio EEG, si se presentaron cambios estadísticamente significativos, presentando diferencia de género, así como también estos resultados indican que hay una diferencia en el desarrollo de redes neuronales implicadas en la respuesta al estudio realizado del perfil EEG con el modelo farmacológico de crisis convulsivas PTZ.

Yerushalmy-Feler en 2014 menciona que no se pueden detectar diferencias en individuos de 6 meses de edad sugiriendo que hay alteraciones estructurales y/ o funcionales. Otro estudio realizado por Korotchikova en 2016, demostró que durante las primeras 48 horas de vida, son trascendentes los efectos de corticosteroides prenatales, los cuales producen un efecto en la modificación de los resultados de dicho experimento (Korotchikova, 2016).

## **Conclusiones**

El tratamiento hormonal durante el periodo crítico de diferenciación sexual es una etapa esencial involucrada en el desarrollo del SNC.

El desarrollo del SNC es diferente en hembras y en machos en las diferentes etapas de desarrollo, en donde se involucran diferentes redes neurales en la respuesta al modelo farmacológico del PTZ.

La alteración al desarrollo del SNC involucra al desarrollo del eje HHG, el cual afecta directamente a la reproducción y las tasas de recambio de la población.

La alimentación con suplementos alimenticios hormonales pueden afectar el periodo crítico de diferenciación sexual, el cual involucra cambios en el desarrollo del SNC.

La respuesta al modelo farmacológico de PTZ son diferentes a las diferentes edades indicando que si juegan un papel las hormonas esteroides en la regulación de la labilidad del SNC.

Los cambios en el perfil EEG demuestran que al intervenir hormonalmente durante el periodo crítico de dimorfismo sexual conduce a cambios en el desarrollo tardío en la formación de redes neurales.

## **Perspectivas**

- Realizar cortes histológicos para observar la población neuronal del hipocampo (estructura involucrada en las CCG)
- Cuantificar la población neuronal del núcleo ventromedial hipotalámico (NVM) que es involucrado en el desarrollo de este en el proceso de dimorfismo sexual
- Realizar análisis de RT-PCR para la cuantificación de RNAm de los RE alfa y beta del Área preóptica hipotalámica

## Bibliografía

- Bäckström T. (1976). Epileptic seizures in women related to plasma estrogen and progesterone during the menstrual cycle. *Acta Neurol. Scand.* 54: 321–347.
- Behrmann, M., & Plaut, D. C. (2015). A vision of graded hemispheric specialization. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1359(1), 30-46.
- Bianchi M.T. and Mac donald R. L. (2003). Neurosteroids shift partial agonist activation of GABA-A receptor channels from low-to high- efficacy gating patterns. *J. Neurosci.* 23: 10934–10943.
- Buchmann, A., Ringli, M., Kurth, S., Schaerer, M., Geiger, A., Jenni, O. G., & Huber, R. (2010). EEG sleep slow-wave activity as a mirror of cortical maturation. *Cerebral Cortex*, 21(3), 607-615.
- Budefeld T., Tobet S. A. and Majdic, G. (2012). Steroidogenic factor 1 and the central nervous system. *J. Neuroendocrinol.* 24: 225–235.
- Camfield, C. S., Berg, A., Stephani, U., & Wirrell, E. C. (2014). Transition issues for benign epilepsy with centrotemporal spikes, nonlesional focal epilepsy in otherwise normal children, childhood absence epilepsy, and juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia*, 55(s3), 16-20.
- Christensen, L. W., Nance, D. M., Shryne, J. E., & Gorski, R. A. (1977). Modifications in gonadotropin control and reproductive behavior in the female rat by hypothalamic and preoptic lesions. *Brain research bulletin*, 2(4), 307-312.
- Clasadonte J., Poulain P., Hanchate N. K., Corfas G., Ojeda S. R. and Prevot V. (2011). Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 16104–16109.
- Cohen R., Pfaff D. (1992). Ventromedian hypothalamic neurons in the mediation of long-lasting effects of estrogen on lordosis behavior. *Prog Neurobiol* 38: 423-453.
- Cohen, E., Wong, F. Y., Wallace, E. M., Mockler, J. C., Odoi, A., Hollis, S., Yiallourou, S. R. (2018). EEG power spectrum maturation in preterm fetal growth restricted infants. *Brain research*, 1678, 180-186.
- CONEVET/CENEVAL. (2000). Guía para la Certificación en el Ejercicio Específico de la Medicina Veterinaria y Zootecnia en Ciencia de los Animales de Laboratorio. México, D.F.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. (1998). Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 19: 323–362.
- Costa, E., & Guidotti, A., Uzunov, D. P., Cooper, T. B., (1996). Fluoxetine-elicited changes in brain neurosteroid content measured by negative ion mass fragmentography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12599-12604.
- Cutler S. M., Cekic M., Miller D. M., Wali B., Van Landingham J. W. and Stein D. G. 2007. Progesterone improves acute recovery after traumatic brain injury in the aged rat. *J. Neurotrauma* 24: 1475–1486.
- Cutler S. M., Pettus E. H., Hoff S.W., and Stein D. G. 2005. Tapered progesterone with drawal enhances behavioral and molecular recovery after traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 195: 423–429. apoptosis

- Desgent, S., Duss, S., Sanon, N. T., Lema, P., Lévesque, M., Hébert, D., Carmant, L. (2012). Early-life stress is associated with gender-based vulnerability to epileptogenesis in rat pups. *PLoS One*, 7(8), e42622.
- Dimayuga F. O., Reed J. L., Carnero G. A., Wang, C., Dimayuga E. R., Dimayuga V. M., Perger A., Wilson M. E., Keller J. N. and Bruce-Keller A. J. (2005). Estrogen and brain inflammation: effects on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines. *J. Neuroimmunol.* 161: 123–136.
- Do Rego, J. L., Seong, J. Y., Burel, D., Leprince, J., Tsutsui, K., Tonon, M. C., ... & Vaudry, H. (2009). Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(3), 259-301.
- Dobbs, K. B., & Hansen, P. J., Denicol, A. C. (2014). Maternal embryokines that regulate development of the bovine preimplantation embryo. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38(6), 589-598.
- Dobbs, K. B., Gagné, D., Fournier, E., Dufort, I., Robert, C., Block, J., ... & Hansen, P. J. (2014). Sexual dimorphism in developmental programming of the bovine preimplantation embryo caused by colony-stimulating factor 2. *Biology of reproduction*, 91(3).
- Döhler, K. D., Srivastava, S. S., Shryne, J. E., Jarzab, B., Sipos, A., & Gorski, R. A. (1984). Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. *Neuroendocrinology*, 38(4), 297-301.
- Dörner, G. (1981). Sex hormone dependent brain differentiation and sexual behavior. *Experimentalbrain research: 3*: 238-242.
- Dörner, G., & Hinz, G. (1967). Homosexuality of neonatally castrated male rats following androgen substitution in adulthood. *German medical monthly*, 12(6), 281-283.
- Eagly, A. H. (2013). *Sex differences in social behavior: A social-role interpretation*. Psychology Press.
- Ebrahimi, L., Saboory, E., Roshan-Milani, S., & Hashemi, P. (2014). Effect of prenatal forced-swim stress and morphine co-administration on pentylenetetrazol-induced epileptic behaviors in infant and prepubertal rats. *Developmental psychobiology*, 56(6), 1179-1186.
- Ergul, Ö. E., & Arihan, O. (2015). Pentylenetetrazole Kindling Epilepsy Model. *Epilepsi: Journal of the Turkish Epilepsi Society*, 21(1).
- Fan, P., & Jordan, V. C. (2014). Acquired resistance to selective estrogen receptor modulators (SERMs) in clinical practice (tamoxifen & raloxifene) by selection pressure in breast cancer cell populations. *Steroids*, 90, 44-52.
- Fernández-Mas, R., Valdés, A., Martínez, A., Magdaleno, V., Almazán, S., Martínez, D., & Fernández-Guardiola, A. (1998). Visualización gráfica de las transiciones de las fases del sueño en el hombre: métodos de representación tridimensional. *Salud mental*, 21(6), 27-32.
- Ferrari, L. F., Khomula, E. V., Araldi, D., & Levine, J. D. (2016). Marked Sexual Dimorphism in the Role of the Ryanodine Receptor in a Model of Pain Chronification in the Rat. *Scientific Reports*, 6.
- Flórez J. (2008). Farmacología humana, quinta edición, Barcelona: Elsevier Masson. 503-505.

Frye, C. A. (2010). Effects and mechanisms of progestogens and androgens in ictal activity. *Epilepsia*, 51(s3), 135-140.

Frye, C. A., Koonce C. J., Walf A. A. (2014). Novel receptor targets for production and action of allopregnanolone in the central nervous system: a focus on pregnane xenobiotic receptor. *Front Cell Neurosci*; 8:106.

Frye, C., et al. (2012). Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of neuroendocrinology*, vol. 24, no 1, p. 144-159.

Genazzani, A. R., Giannini, A., & Simoncini, T. (2017). Dimorphism of Human Brain: The Basis of the Gender Differences. In *Frontiers in Gynecological Endocrinology* (pp. 1-8). Springer International Publishing.

Giorgi, F. S., Galanopoulou, A. S., & Moshé, S. L. (2014). Sex dimorphism in seizure-controlling networks. *Neurobiology of disease*, 72, 144-152.

Gorski A. (1986). Sexual Differentiation of the Brain: A Model for Drug-Induced Alterations of the Reproductive System. *Environmental Health Perspectives*: 70: 163-175.

Gorski R. (1978). Evidence for morphological sex differences within the medial preoptic area for the rat brain. *Brain Res* 148: 333-346.

Gorski R. (1985). Sexual dimorphism of the brain. *J Anim Sci*. 61: 1001-1004.

Gorski R., Warner J. (1965). Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinology*. 76: 226-239.

Guénet J-L, Bonhomme F. (2003). Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends in Genetics*: 19: 24-31.

Gur, R. C., Sachs, G., Steger-Wuchse, D., Kryspin-Exner, I., & Katschnig, H. (2004). Facial recognition deficits and cognition in schizophrenia. *Schizophrenia research*, 68(1), 27-35.

He X. P., Kotloski R., Nef S., Luikart B. W., Parada L. F. and McNamara J. O. (2004). Conditional deletion of TrkB but not BDNF prevents epileptogenesis in the kindling model. *Neuron* 43: 31–42.

Herrera GH, Vergara OM, Rosado-García A, Rosale TA (2005). Diferenciación sexual en el sistema nervioso central. *Vet Méx*: 36:339-360.

Herrera, G., et al. (2013). Genetic expression associated to cell cycle, apoptosis, synaptogenesis and cell differentiation during sex differentiation in rats. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* vol. 4, núm. 3, pp. 289-304.

Herzog A. G. (2002). Altered reproductive endocrine regulation in men with epilepsy: implications for reproductive function and seizures. *Ann. Neurol*. 51: 539–542.

Hosseini, M., Sadeghnia, H., Salehabadi, S., & Soukhtanloo, M. (2013). Contribution of estradiol in sex-dependent differences of pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Acta Physiologica Hungarica*, 100(2), 237-245.



Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y & Fauser BC. (2015) Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews* 36 1-24.

Huang GZ, Woolley CS (2012). Estradiol acutely suppresses inhibition in the hippocampus through a sex-specific endocannabinoid and mGluR-dependent mechanism. *Neuron* 74:801– 808.

Jones, N. C. (2016). Potentiating the Strength of Extrasynaptic Currents by Neurosteroid Hormones. *Epilepsy Currents*, 16(4), 261–262. <http://doi.org/10.5698/1535-7511-16.4.261>

Jones, N. C., O'Brien, T. J., & Carmant, L. (2014). Interaction between sex and early-life stress: influence on epileptogenesis and epilepsy comorbidities. *Neurobiology of disease*, 72, 233-241.

Juntti, Scott A., et al. (2010). The androgen receptor governs the execution, but not programming, of male sexual and territorial behaviors. *Neuron*, vol. 66, no 2, p. 260-272.

Kaminski R. M., Livingood M. R. and Rogawski M. A. (2004). Allopregnanolone analogs that positively modulate GABA receptors protect against partial seizures induced by 6-Hz electrical stimulation in mice. *Epilepsia* 45: 864–877.

Kettner, L. O., Ramlau-Hansen, C. H., Kesmodel, U. S., Bay, B., Matthiesen, N. B., & Henriksen, T. B. (2016). Parental Infertility, Fertility Treatment, and Childhood Epilepsy: A Population-Based Cohort Study. *Paediatric and perinatal epidemiology*, 30(5), 488-495.

Koolen, N., Dereymaeker, A., Räsänen, O., Jansen, K., Vervisch, J., Matic, V., ... & Vanhatalo, S. (2016). Early development of synchrony in cortical activations in the human. *Neuroscience*, 322, 298-307.

Koppel, B. S., & Harden, C. L. (2014). Gender issues in the neurobiology of epilepsy: A clinical perspective. *Neurobiology of disease*, 72, 193-197.

Korotchikova, I., Stevenson, N. J., Livingstone, V., Ryan, C. A., & Boylan, G. B. (2016). Sleep–wake cycle of the healthy term newborn infant in the immediate postnatal period. *Clinical Neurophysiology*, 127(4), 2095-2101.

Larsson K. and Heimer L. (1964). Mating behavior of male rats after lesions in the preoptic area. *Nature*. 202: 413–414.

Ledoux, V. A., Smejkalova, T., May, R. M., Cooke, B. M., & Woolley, C. S. (2009). Estradiol facilitates the release of neuropeptide Y to suppress hippocampus-dependent seizures. *Journal of Neuroscience*, 29(5), 1457-1468.

Lenz K. M., Bridget M., Nugent and Margaret M. McCarthy. (2012). Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. *Frontiers in neuroscience*. Program in Neuroscience and Department of Physiology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA.

Lenz K., McCarthy M. (2010). Organized for sex-steroid hormones and the developing hypothalamus. *Eur J Neurosci*. 32: 2096-2104.

Leroy, J. L. M. R., Sturmey, R. G., Van Hoeck, V., De Bie, J., McKeegan, P. J., & Bols, P. E. J. (2014). Dietary fat supplementation and the consequences for oocyte and embryo quality: hype or significant benefit for dairy cow reproduction?. *Reproduction in domestic animals*, 49(3), 353-361.

- Li, Z., Davis, M. A., Higgins, J., Gilbert-Diamond, D., Baker, E. R., Das, A., & Karagas, M. R. (2015). Preliminary analysis of in utero low-level arsenic exposure and fetal growth using biometric measurements extracted from fetal ultrasound reports. *Environmental Health*, *14*(1), 12.
- Luijtelaar, G., Onat, F. Y., & Gallagher, M. J. (2014). Animal models of absence epilepsies: what do they model and do sex and sex hormones matter?. *Neurobiology of disease*, *72*, 167-179.
- Lüttjohann, A., Fabene, P. F., & van Luijtelaar, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & behavior*, *98*(5), 579-586.
- Magdaleno-Madrigal, V. M., Contreras-Murillo, G., Camacho-Abrego, I., Negrete-Díaz, J. V., Valdés-Cruz, A. (2017). Short-term deep brain stimulation of the thalamic reticular nucleus modifies aberrant oscillatory activity in a neurodevelopment model of schizophrenia. *Neuroscience*.
- Magdaleno-Madrigal, V. M., Valdés-Cruz, A., Martínez-Vargas, D., Almazán-Alvarado, S., & Fernández-Mas, R. (2014). Effect of vagus nerve stimulation on electrical kindling in different stages of seizure severity in freely moving cats. *Epilepsy research*, *108*(1), 81-89.
- Matsumoto A., Arai Y. (1997). Sexual differentiation of neuronal circuitry in the neuroendocrine hypothalamus. *Biomedical Reviews*. Department of Anatomy, Juntendo University School of Medicine. Hongo, Tokyo, Japan. 7: 5-15.
- McCarthy M. (2008). Estradiol and the Developing Brain. *Physiol Rev* 88: 91-134.
- McCarthy M., Anne T., Konkle M., Margaret M. (2011). Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology* 152: 223-235.
- McHugh, J. C., & Delanty, N. (2008). Epidemiology and classification of epilepsy: gender comparisons. *International review of neurobiology*, *83*, 11-26.
- McPherson, F. J., & Chenoweth, P. J. (2012). Mammalian sexual dimorphism. *Animal reproduction science*, *131*(3), 109-122.
- Meffre D., Pianos A., Liere P., Eychenne B., Cambourg A., Schumacher M. (2007). Steroid profiling in brain and plasma of male and pseudopregnant female rats after traumatic brain injury: analysis by gas chromatography/mass spectrometry. *Endocrinology* 148: 2505–2517.
- Melcangi, R. C., & Garcia-Segura, L. M. (2010). Sex-specific therapeutic strategies based on neuroactive steroids: in search for innovative tools for neuroprotection. *Hormones and behavior*, *57*(1), 2-11.
- Miller, S. L., Huppi, P. S., & Mallard, C. (2016). The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *The Journal of physiology*, *594*(4), 807-823.
- Mínguez-Alarcón, L., Chavarro, J. E., Mendiola, J., Roca, M., Tanrikut, C., Vioque, J., Torres-Cantero, A. M. (2017). Fatty acid intake in relation to reproductive hormones and testicular volume among young healthy men. *Asian Journal of Andrology*, *19*(2), 184.
- Mohammed, H. H., Badawi, M. E., El-Tarabany, M. S., & Rania, M. (2016). Effects of boldenone undecylenate on growth performance, maintenance behaviour, reproductive hormones and carcass traits of growing rabbits. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *19*(2), 245-251.

- Nacka-Aleksić, M., Djikić, J., Pilipović, I., Stojić-Vukanić, Z., Kosec, D., Bufan, B., ... & Leposavić, G. (2015). Male rats develop more severe experimental autoimmune encephalomyelitis than female rats: sexual dimorphism and diergism at the spinal cord level. *Brain, behavior, and immunity*, *49*, 101-118.
- Nevalainen, P., Rahkonen, P., Pihko, E., Lano, A., Vanhatalo, S., Andersson, S., Lauronen, L. (2015). Evaluation of somatosensory cortical processing in extremely preterm infants at term with MEG and EEG. *Clinical Neurophysiology*, *126*(2), 275-283.
- Nunez JL, McCarthy MM (2008) Androgens predispose males to GABA-mediated excitotoxicity in the developing hippocampus. *Exp Neurol* *210*: 699 – 708.
- Ojeda S. R., Negro Vilar A. and Mc Cann S. M. (1979). Release of prostaglandin Es by hypothalamic tissue: evidence for their involvement in catecholamine induced luteinizing hormone releasing hormone release. *Endocrinology*. *104*: 617–624.
- Omidvarnia, A., Metsäranta, M., Lano, A., & Vanhatalo, S. (2015). Structural damage in early preterm brain changes the electric resting state networks. *Neuroimage*, *120*, 266-273.
- Pantoja-Jiménez, C. R., Magdaleno-Madriral, V. M., Almazán-Alvarado, S., & Fernández-Mas, R. (2014). Anti-epileptogenic effect of high-frequency stimulation in the thalamic reticular nucleus on PTZ-induced seizures. *Brain stimulation*, *7*(4), 587-594.
- Pantoja-Jiménez, C. R., Magdaleno-Madriral, V. M., Bazaldúa, A., Fernández-Mas, R., Almazán-Alvarado, S., Bolaños-Alejos, F. & Ramírez-Rodríguez, G. B. (2016). Acute deep brain stimulation in the thalamic reticular nucleus protects against acute stress and modulates initial events of adult hippocampal neurogenesis. *Behavioural brain research*, *314*, 65-76.
- Panzica, G., & Melcangi, R. C. (2016). Structural and molecular brain sexual differences: a tool to understand sex differences in health and disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *67*, 2-8.
- Park, J. S., Jo, D. G., Arumugam, T. V., Woo, H. N., Tang, S. C., Mughal, M., Camandola, S. (2010). Evidence that  $\gamma$ -secretase mediates oxidative stress-induced  $\beta$ -secretase expression in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, *31*(6), 917-925.
- Phoenix C., Goy R., Young W. (1959). Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissue mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*. *65*: 369-382.
- Pitkänen, A., & Lukasiuk, K. (2009). Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, *14*(1), 16-25.
- Pitkänen, A., Bolkvadze, T., & Immonen, R. (2011). Anti-epileptogenesis in rodent post-traumatic epilepsy models. *Neuroscience letters*, *497*(3), 163-171.
- Polenzani, L., Hershey, A. D., Woodward, R. M., Miledi, R., & Krause, J. E. (1991). Molecular and genetic characterization, functional expression, and mRNA expression patterns of a rat substance P receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *632*(1), 63-78.
- Purves D., Augustine G., Fitzpatrick D., Hall W., LaMantia A., McNamara J., Williams S. (2004). Neurotransmisores y sus receptores. *Neurociencia 3ª edición*.
- Raisman G., Field P. (1973). Sexual dimorphism in the neuropil area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res*. *54*: 1-29.

Ramos F. R., Correa J., Saavedra M., Acosta M. E., Gasca E., Pérez A., Trujillo J. (2012). Modelo PTZ: un screening primario para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante. *Arch Neurocién (Mex)*. Vol. 17, No. 1: 45-48

Reddy D. S. (2008). Mass spectrometric quantification and physiological- pharmacological activity of androgenic neurosteroids. *Neurochem.Int.* 52: 541–553.

Reddy D. S. (2009). The role of neurosteroids in the pathophysiology and treatment of catamenial epilepsy. *Epilepsy Res.* 85: 1–30.

Reddy D. S. (2011). Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy. *Front.Endocrinol.* 2: 38.

Reddy D. S. and Rogawski M. A. (2010). Ganaxolone suppression of behavioral and electrographic seizures in the mouse amygdala kindling model. *Epilepsy Res.* 89: 254–260.

Reddy D. S. and Rogawski M. A. (2012). "Neurosteroids endogenous regulators of seizure susceptibility and role in the treatment of epilepsy (Chapter77),"in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4th Edn, edsJ.

Reddy Samba, D. (2017). Sex differences in the anticonvulsant activity of neurosteroids. *Journal of neuroscience research*, 95(1-2), 661-670.

Reddy, Doodipala Samba. (2015). Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. *Neuronal mechanisms of epileptogenesis*.

Reddy, S. D. (2013). Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. Department of Neuroscience and Experimental Therapeutics, College of Medicine, Texas A&M University Health Science Center, Bryan, TX, USA. Vo. 7 pp 1 – 20.

Rodríguez, N. (2016). Regulación de la expresión y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH): Los glucocorticoides como inhibidores de la reproducción. Revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 13(2), 136-142.

Romano, E., Cosentino, L., Laviola, G., & De Filippis, B. (2016). Genes and sex hormones interaction in neurodevelopmental disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 67, 9-24.

Roof R. L. and Hall E. D. (2000). Gender differences in acute CNS trauma and stroke, neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J. Neurotrauma*. 17: 367–388.

Saalmann, Y. B., Kirkcaldie, M. T. K., Waldron, S., & Calford, M. B. (2007). Cellular Distribution of the GABAA Receptor-Modulating 3 $\alpha$ -Hydroxy, 5 $\alpha$ -Reduced Pregnane Steroids in the Adult Rat Brain. *Journal of neuroendocrinology*, 19(4), 272-284.

Sakkalis, V. (Ed.). (2015). *Modern Electroencephalographic Assessment Techniques*. Humana Press.

Salzberg, M., Kumar, G., Supit, L., Jones, N. C., Morris, M. J., Rees, S., & O'brien, T. J. (2007). Early postnatal stress confers enduring vulnerability to limbic epileptogenesis. *Epilepsia*, 48(11), 2079-2085.

Schwarz J., McCarthy M. (2008). Cellular mechanisms of estradiol mediated masculinization of the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 109: 300-306.

Seker, F. B., Yorulmaz, H., Kaptan, E., Caglayan, B., & Oztas, B. (2016). Gestational treatment of folic acid attenuates blood–brain barrier leakage in pregnant and prepubertal rats after pentylenetetrazole-induced seizure. *Nutritional neuroscience*, 19(2), 55-62.

Shader, R. I. (2017). 2017, Sexual Dimorphism, Sexual Pluralism, and More. *Clinical therapeutics*, 39(1), 1-5.

Shah, A., Atkinson, M., Hari, K., Schaefer, K., Bhattacharya, P., & Shah, A. (2012). Safety considerations in the epilepsy monitoring unit for psychogenic nonepileptic seizures. *Epilepsy & Behavior*, 25(2), 176-180.

Shany, E., Meledin, I., Gilat, S., Yogev, H., Golan, A., & Berger, I. (2014). In and ex utero maturation of premature infants electroencephalographic indices. *Clinical Neurophysiology*, 125(2), 270-276.

Simerly R. (2002). Wired for reproduction: Organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Ann Rev Neurosci*. 25: 507-536.

Sitnikova, E., Hramov, A. E., Grubov, V., & Koronovsky, A. A. (2016). Rhythmic activity in EEG and sleep in rats with absence epilepsy. *Brain research bulletin*, 120, 106-116.

Stein D. G. (2013). A clinical/ translational perspective: can a developmental hormone play a role in the treatment of traumatic brain injury? *Horm. Behav.* 63: 291–300.

Swaab D, Bao A-M. (2013). Sexual differentiation of the human brain in relation to gender-identity, sexual orientation, and neuropsychiatric disorders. In *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, ed. DW Pfaff, pp. 2973–98. New York: Springer.

Tabatadze, N., Huang, G., May, R. M., Jain, A., & Woolley, C. S. (2015). Sex differences in molecular signaling at inhibitory synapses in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35(32), 11252-11265.

Taubøll, E., Sveberg, L., Svalheim, S. (2015). Interactions between hormones and epilepsy. Department of Neurology, Oslo University Hospital. *Seizure* 28: 3–11

Toonen, J. A., Solga, A. C., Ma, Y., & Gutmann, D. H. (2016). Estrogen activation of microglia underlies the sexually dimorphic differences in Nf1 optic glioma–induced retinal pathology. *Journal of Experimental Medicine*, jem-20160447.

Valdés-Cruz, A., Magdaleno-Madrugal, V. M., Martínez-Vargas, D., Fernández-Mas, R., & Almazán-Alvarado, S. (2008). Long-term changes in sleep and electroencephalographic activity by chronic vagus nerve stimulation in cats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(3), 828-834.

Valdés-Cruz, A., Negrete-DíAZ, J. V., Magdaleno-Madrugal, V. M., Martínez-Vargas, D., Fernández-Mas, R., Almazán-Alvarado, S., Flores, G. (2012). Electroencephalographic activity in neonatal ventral hippocampus lesion in adult rats. *Synapse*, 66(8), 738-746.

Velíšek, L. (2005). Prenatal corticosteroid impact on hippocampus: implications for postnatal outcomes. *Epilepsy & Behavior*, 7(1), 57-67.

Velísková J. and Velíšek L. (2007). Beta – estradiol increases dentate gyrus inhibition in female rats via augmentation of hilar neuropeptide-Y. *J. Neurosci.* 27: 6054–6063.

- Velíšková, J. (2006). The role of estrogens in seizures and epilepsy: the bad guys or the good guys?. *Neuroscience*, 138(3), 837-844.
- Velíšková, J. (2009). "Sex differences in seizure susceptibility", in *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research*, ed. Philip Schwartz kroin (Oxford: Academic Press), 1–4.
- Velíšková, Jana; Desantis, Kara A. (2013). Sex and hormonal influences on seizures and epilepsy. *Hormones and behavior*, vol. 63, no 2, p. 267-277.
- Verrotti, A., Prezioso, G., D'Egidio, C., & Belcastro, V. (2015). Reproductive hormones in epilepsy therapy: from old promises to new hopes. In *Epilepsy Towards the Next Decade* (pp. 201-211). Springer International Publishing.
- von Philipsborn AC, orchel S, Tirian L, Demir E, Morita T, et al. (2014). Cellular and behavioral functions of *fruitless* isoforms in *Drosophila* courtship. *Curr. Biol.* 24:242–51.
- Walker, Deena M.; GORE, Andrea C. (2011). Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 7, no 4, p. 197-207.
- Wang, H. H., Cui, Q., Zhang, T., Guo, L., Dong, M. Z., Hou, Y., & Sun, Q. Y. (2016). Removal of mouse ovary fat pad affects sex hormones, folliculogenesis and fertility. *Journal of Endocrinology*, 232(2), 155-164.
- Werling, D. M., Parikshak, N. N., & Geschwind, D. H. (2016). Gene expression in human brain implicates sexually dimorphic pathways in autism spectrum disorders. *Nature communications*, 7.
- Wilson, J. D., Griffin, J. E., & George, F. W. (2013). The Role of Gonadal Steroids in Sexual Differentiation". In *Recent Progress in Hormone Research: Proceedings of the 1980 Laurentian Hormone Conference* (p. 1). Academic Press.
- Wright, D. W., & Kellermann, A. L., Stein, D. G. (2008). Does progesterone have neuroprotective properties?. *Annals of emergency medicine*, 51(2), 164-172.
- Wu, Y., Sun, L., Pan, J., Peng, Y., Li, J., Liu, X., Qin, W. (2013). Anabolic steroids reduce spinal cord injury-related bone loss in rats associated with increased Wnt signaling. *The journal of spinal cord medicine*, 36(6), 616-622.
- Xiao, G., Wei, J., Yan, W., Wang, W., & Lu, Z. (2008). Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *Critical Care*, 12(2), R61.
- Yang, C. F., & Shah, N. M. (2014). Representing sex in the brain, one module at a time. *Neuron*, 82(2), 261-278.
- Yerushalmy-Feler, A., Marom, R., Peylan, T., Korn, A., Haham, A., Mandel, D., ... & Bassan, H. (2014). Electroencephalographic characteristics in preterm infants born with intrauterine growth restriction. *The Journal of pediatrics*, 164(4), 756-761.
- Yonehara K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihar M. (2003). Expression analyses of sex steroid-regulated genes in neonatal rat hypothalamus. *J Reprod Dev*: 49: 547-52.

Yonehara, K., Suzuki, M., Yamanouchi, K., & Nishihara, M. (2003). Expression analyses of sex steroid-regulated genes in neonatal rat hypothalamus. *Journal of Reproduction and Development*, 49(6), 547-552.

Zilkha, N., Scott, N., & Kimchi, T. (2017). Sexual Dimorphism of Parental Care: From Genes to Behavior. *Annual review of neuroscience*.

## Anexo 1

### Presentación de resultados en congresos

1. Presentación de cartel **“Efecto de xenoestrógenos durante el periodo crítico dimórfico sexual sobre las crisis convulsivas inducidas con Pentilentetrazol”**, Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco, 6° Congreso y 2ª Feria Técnico-científica del Departamento de Producción Agrícola y Animal 2017. División de Ciencias Biológicas. 16 al 20 de Octubre del 2017.
2. Presentación de cartel **“Efectos hormonales durante el periodo crítico de diferenciación sexual en la susceptibilidad a crisis convulsivas”**, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FESZ-UNAM), área de psicología clínica y de la salud. Semana del cerebro del 12 al 16 de Marzo del 2018.
3. Presentación de cartel **“Efecto hormonal durante el periodo crítico de la diferenciación sexual y su repercusión en la sensibilidad a las crisis convulsivas inducidas por PTZ”**, XLIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción AIBIR. 27 al 30 de Mayo del 2018.
4. Presentación de cartel **“Efecto de xenoestrógenos durante el periodo crítico dimórfico sexual sobre la epileptogénesis inducida con Pentilentetrazol”**, LXI Congreso de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas 2018. 12 al 16 de Agosto del 2018.