



**EFFECTO DE LOS ANDRÓGENOS SOBRE LAS PROTEÍNAS DE MIELINA Y  
LOS OLIGODENDROCITOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE  
ENFERMEDAD DE MOTONEURONA, EL RATÓN WOBBLER**

**Iván José Esperante**

**Matricula Nro 1402-2526**

**Lic. Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Universidad de Belgrano**

**Tutora: Dra. María Claudia Gonzalez Deniselle**

**Co-tutora: Dra. María Meyer**

**Laboratorio de Bioquímica Neuroendocrina**

**Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET**

**2021**

## Resumen

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad que presenta degeneración de motoneuronas asociada a atrofia muscular en miembros superiores e inferiores, dificultades para la deglución y disartria. El ratón Wobbler es un modelo animal de ELA que presenta pérdida selectiva de motoneuronas, astrocitosis y microgliosis en el asta ventral de la médula espinal cervical (MEC), tronco encefálico y corteza motora. La incidencia de ELA es mayor en hombres que en mujeres; sin embargo, aumenta en mujeres en la postmenopausia, sugiriendo un rol preponderante de los esteroides sexuales en la ELA. En este trabajo, se investigó el efecto de 2 meses de tratamiento con testosterona en Wobbler machos en estadio sintomático. El tratamiento consistió en implante s.c. de tubos de silastic de 10 mm conteniendo testosterona cristalina. Los ratones Wobbler y controles que permanecieron sin tratamiento se implantaron con silastic de 10mm vacíos. Se estudió en MEC: 1) la inmunoreactividad (IR) para la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), marcador de astrocitos 2) el ARNm para factores inflamatorios, 3) la IR para la enzima que impide la toxicidad del glutamato en la hendidura sináptica, la glutamina sintetasa (GS), 4) la densidad de oligodendrocitos maduros CC1+ y la IR para la proteína básica de mielina (MBP). Asimismo, a nivel clínico analizamos el efecto sobre el trofismo muscular. El peso de las vesículas seminales, tejido blanco androgénico, fue mayor en Wobbler + testosterona vs. Wobbler ( $p < 0,05$ ). Se demostró que los Wobbler + testosterona presentaron menor astrocitosis GFAP + en sustancia gris (asta ventral) y sustancia blanca [funículo ventro-lateral (FVL)], y menor expresión del ARNm para factores proinflamatorios como  $TNF\alpha$  y TLR4 asociado a una mayor expresión del ARNm para el factor antiinflamatorio  $TGF\beta$  y mayor IR para GS vs. Wobbler no tratados. Para evaluar la mielina, se utilizó tinción de Luxol fast blue (LFB). En FVL se cuantificó el % de área LFB+ por encima de un umbral, la cual fue menor en Wobbler vs. controles ( $p < 0.001$ ) y Wobbler + testosterona ( $p < 0.01$ ). Los Wobbler mostraron menor densidad de oligodendrocitos CC1+/área en relación a controles ( $p < 0,05$ ) y a Wobbler + testosterona ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, la IR para MBP fue mayor en Wobbler que controles ( $p < 0,05$ ) aunque significativamente menor que en Wobbler + testosterona ( $p < 0.05$ ). La testosterona es un esteroide complejo que ejerce sus efectos directamente a través de los receptores de andrógenos (AR) e indirectamente a través de los receptores de estrógenos (ER) por aromatización a estradiol. Se analizó el metabolismo de testosterona en MEC. Las MEC de Wobbler + testosterona mostraron niveles de andrógenos similares a controles, aunque superiores a Wobbler no tratados, específicamente de testosterona,  $5\alpha$ -DHT y  $3\beta$ -androstenediol. Los niveles de estradiol fueron indetectables en todos los grupos experimentales. El ARNm para  $ER\alpha$  y aromatasa fueron mayores en MEC de Wobbler vs controles y menores en los Wobbler + testosterona. El músculo bíceps brachii, evaluado tanto por el peso del músculo como el área de las fibras, mostró una atrofia importante en los Wobbler ( $p < 0,05$  vs. Controles) que se redujo en los Wobbler + testosterona ( $p < 0.01$  vs Wobbler). En conjunto, nuestros hallazgos indican un efecto antiinflamatorio, mielinizante y protector de la testosterona en la médula espinal en degeneración.

Palabras clave: andrógenos, esclerosis lateral amiotrófica, neuroprotección, células gliales

## Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>2</b>
<b>Índice .....</b>	<b>3</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>5</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>6</b>
Sistema nervioso central y sus células .....	6
Factores inflamatorios.....	8
Mielinización.....	9
Remielinización .....	10
Esclerosis lateral amiotrófica .....	10
Clínica de la ELA .....	11
Modelos animales ELA.....	12
El ratón Wobbler .....	12
Hormonas esteroideas.....	13
Neuroesteroides .....	15
Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas.....	15
Testosterona .....	16
Metabolismo de la testosterona y mecanismos de acción.....	17
<b>Antecedentes .....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivo general.....</b>	<b>20</b>
<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>20</b>
<b>Hipótesis de trabajo .....</b>	<b>20</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>21</b>
Animales experimentales .....	21
Tratamiento esteroide.....	21
Determinación de parámetros clínicos y nivel funcional .....	22
Tinción Luxol Fast Blue (LFB).....	22
Técnicas Inmunohistoquímicas e Inmunofluorescencia.....	22
Técnica de cortes semifinos y tinción con azul de toluidina.....	24
Técnicas de RT-PCR en tiempo real .....	25
Cromatografía gaseosa / espectrometría de masas (GC/MS) .....	25
Análisis estadístico .....	26

<b>Resultados .....</b>	<b>27</b>
<b>Efectos de la testosterona sobre células astrogliales y mediadores proinflamatorios.....</b>	<b>27</b>
<b>Efectos del tratamiento con testosterona sobre los oligodendrocitos y las proteínas de la mielina .....</b>	<b>30</b>
<b>Efecto del tratamiento con testosterona sobre la relación mielina/axón en sustancia blanca de animales Wobbler .....</b>	<b>34</b>
<b>Niveles de testosterona y sus metabolitos en médula espinal cervical .....</b>	<b>36</b>
<b>Efectos del tratamiento con testosterona sobre parámetros clínicos, trofismo muscular y peso corporal .....</b>	<b>37</b>
<b>Efectos de la testosterona sobre las glándulas endócrinas .....</b>	<b>40</b>
<b>Efectos del tratamiento con testosterona sobre los receptores de esteroides y las enzimas del metabolismo de los andrógenos .....</b>	<b>41</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>43</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>47</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>49</b>
<b>Apéndice .....</b>	<b>55</b>

## Agradecimientos

A mis padres y hermana por apoyarme en la decisión de irme a vivir solo y por haberme dado todo lo necesario para estudiar la carrera que elegí.

Al Dr. Alejandro De Nicola y mi directora Claudia por haberme dado la posibilidad de iniciarme en el mundo de la investigación con ellos. A todo el equipo del laboratorio por su buena predisposición, especialmente a las técnicas Analía y Paulina por enseñarme y ayudarme en cada una de las cosas que aprendí.

A todos mis compañeros de la Facultad por su buena onda, las juntadas de estudio y por hacer que cada día de cursada fuese divertido.

A todos mis amigos de la infancia, que por más de habernos visto poco estos años siempre estuvieron ahí.

# Introducción

## Sistema nervioso central y sus células

El sistema nervioso central (SNC) se puede distinguir morfológicamente en dos regiones principales: sustancia gris y blanca. Los cuerpos de las células neuronales y las dendritas se concentran en la sustancia gris, donde se recibe, procesa e integra la información y las funciones motoras y sensitivas, mientras que la sustancia blanca está formada por haces de axones aislados por una estructura lipídica llamada mielina.

La mielina es un conjunto de múltiples capas de membrana uniformemente gruesa con una estructura periódica característica de capas alternas densas en electrones y capas ligeras según lo revelado por microscopía electrónica (ME) (Hartline, 2008). La línea densa principal representa las membranas de mielina citoplasmática estrechamente condensadas, mientras que la línea entre periodos consiste en las membranas externas fuertemente opuestas. La compactación entre las membranas en cada una de estas capas es estrecha y da como resultado una periodicidad de aproximadamente 12 nm. Los segmentos mielinizados de los axones solo están interrumpidos por pequeños espacios, los nódulos de Ranvier. Esta organización reduce la capacitancia transversal y aumenta la resistencia transversal de la membrana axonal internodal, lo que permite la propagación saltatoria de potenciales de acción a lo largo del axón a velocidades de 50 a 100 veces más rápidas que en axones amielínicos del mismo calibre (Monje, 2018; Zalc et al., 2008).

La mielina en el SNC es generada por un tipo especial de glía llamado oligodendrocitos, que extienden muchos procesos, cada uno de los cuales contacta y envuelve repetidamente los axones como se muestra en la Figura 1 (Bunge, 1968).

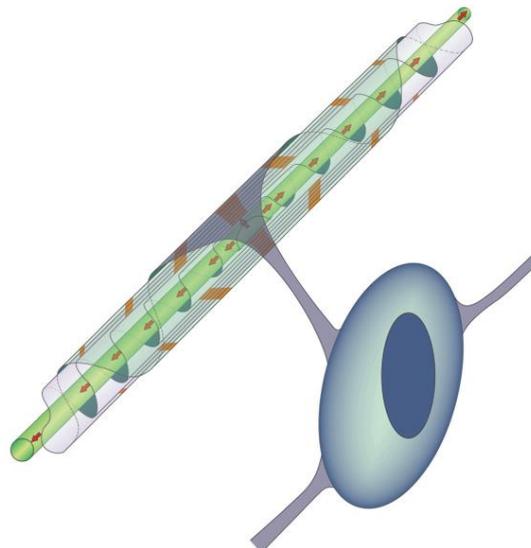


Figura 1. Modelo que muestra la dirección del proceso de mielinización de axones por oligodendrocitos. (Snaidero et al. 2014)

Los oligodendrocitos se pueden clasificar en dos tipos principales: células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) y células mielinizantes maduras. Cada categoría es morfológicamente distinta: las OPC son células bipolares, de naturaleza migratoria y proliferativa, mientras que los

oligodendrocitos maduros son células altamente ramificadas especializadas para producir láminas de mielina y carecen de capacidad de proliferación y migración, característica por la cual los oligodendrocitos maduros son más propensos a sufrir daños en comparación con las OPC. Es importante destacar que tienen un potencial limitado de regeneración en respuesta a cualquier daño en sus procesos o en la vaina de mielina (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Miller, 2002).

Durante el desarrollo, las OPC aparecen por primera vez alrededor del día 12 del embrión en ratones, casi al mismo tiempo en la región ventral de la médula espinal denominada dominio pMN y así como en la eminencia gangliónica media de la región ventral del cerebro. Las primeras OPC proliferan, migran y pueblan preferentemente las futuras regiones de sustancia blanca del SNC (Kessaris et al., 2006). La transición de OPC a oligodendrocitos maduros es principalmente un evento embrionario tardío o posnatal temprano; el proceso se completa con P60 en ratones y en la edad adulta en humanos. Durante este proceso de diferenciación, las OPC experimentan una transformación morfológica, aumentando sus ramificaciones y expresando secuencialmente diferentes marcadores celulares y factores de transcripción que se utilizan para caracterizar las diferentes etapas de desarrollo del linaje de los oligodendrocitos (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Elbaz & Popko, 2019). Los oligodendrocitos maduros expresan específicamente las proteínas de la mielina central; proteína proteolipídica (PLP), proteína básica de mielina (MBP), glicoproteína oligodendrocitaria de mielina (MOG), glicoproteína asociada a mielina (MAG), poliposis coli adenomatosa (APC / CC1), 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesteras (CNPasa) y factor de transcripción sox10.

Estudios in vitro demostraron que los oligodendrocitos maduros son capaces de formar membranas similares a la mielina y vainas de mielina (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Jackman et al., 2009). A pesar de que estas células juegan un papel principal en la producción de mielina, su función se encuentra en gran parte influenciada por otras células gliales como los astrocitos y la microglía. Los astrocitos en particular proporcionan lípidos para la síntesis de las vainas de mielina durante el desarrollo y contribuyen tanto al proceso de diferenciación de oligodendrocitos, así como a los procesos de mielinización y remielinización. Las conexiones intercelulares entre astrocitos y oligodendrocitos, representadas en la Figura 2, son vitales para el correcto funcionamiento de los mismos, producen varios factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de la plaquetas (PDGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o el factor neurotrófico ciliar (CNTF) para promover el desarrollo de OPC y la mielinización del SNC y ayudan en la eliminación de los restos de mielina (Moore et al., 2011; Raff et al., 1988). Además, los astrocitos expresan la enzima glutamina sintetasa (GS), cuya principal función es catalizar la degradación de glutamato en glutamina. Enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y esclerosis múltiple presentan un metabolismo alterado del glutamato donde se ve aumentada su expresión o disminuida su degradación. La evidencia de esta desregulación surgió por primera vez a partir de la demostración de niveles aumentados de glutamato en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con ELA (Shaw et al., 1995). Si bien el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio de la corteza cerebral, altas concentraciones del mismo en regiones del SNC como la médula espinal generan una excitotoxicidad ligada a daño neuronal (Macrez et al., 2016).

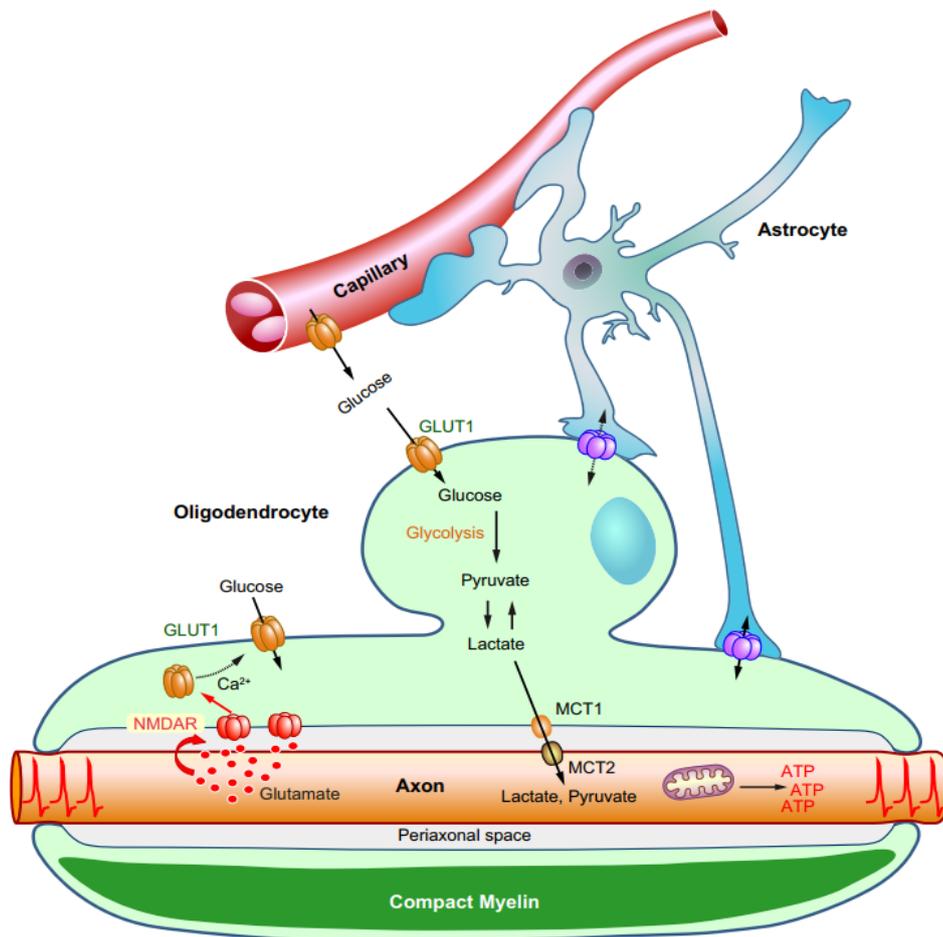


Figura 2. Ilustración esquemática del acoplamiento metabólico de oligodendrocitos, astrocitos y neuronas. (Stadelmann et al., 2019)

Las células de la microglía pertenecen al sistema inmunológico innato y son los macrófagos tisulares residentes del SNC, incluidos el cerebro, la médula espinal, la retina y el bulbo olfatorio. Se origina en el saco vitelino. Es un tipo celular caracterizado por un cuerpo pequeño con procesos finos y ramificados. La microglía tiene una multitud de funciones, como el apoyo al desarrollo y la sinaptogénesis del SNC, el mantenimiento de la homeostasis y la estructura, la contribución a una respuesta inmune contra agentes infecciosos y la participación en la neurogénesis adulta, neuroinflamación, enfermedades degenerativas, accidente cerebrovascular, trauma y regeneración (Casano & Peri, 2015). Como los astrocitos, la microglía juega un rol crucial tanto en el desarrollo como en la reparación de la oligodendrogénesis y mielinización (Traiffort et al., 2020).

### Factores inflamatorios

La respuesta inflamatoria en el SNC está dada por la activación de las células de la microglía y astrocitos, expresión de mediadores inflamatorios y una invasión controlada de células inflamatorias periféricas. La mayoría de las reacciones inflamatorias son mediadas por citoquinas, las cuales son moléculas de señalización importantes sintetizadas por las células inmunes en los tejidos periféricos y

la sangre, y por las células gliales y otras células residentes en el SNC (Tortelli et al., 2020). Un rasgo característico de las citoquinas es su redundancia funcional y pleiotropismo. Una amplia variedad de tipos de células responde a las citoquinas, regulando así la señalización del sistema inmunológico, la inflamación y el trauma. Una de las principales citoquinas es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), el cual tiene un rol central en el inicio y orquestación de la inmunidad y la inflamación. El TNF $\alpha$  participa en la inflamación local y sistémica con acciones pleiotrópicas que incluyen funciones proinflamatorias y también antiinflamatorias. Esta citoquina se ha relacionado con la muerte de las motoneuronas que se produce en pacientes con ELA y modelos animales (Poloni et al., 2000). A su vez, como se mencionó anteriormente en la inflamación del SNC participan los astrocitos. En estado reactivo, los astrocitos expresan proteínas como la óxido nítrico sintasa inducible (inducible nitric oxide synthase [iNOS]), que por medio de una producción de óxido nítrico que alcanza niveles tóxicos pueden intensificar el daño causado por una lesión aumentando así la inflamación (Barbeito et al., 2004).

## **Mielinización**

Históricamente la mielinización se ha considerado un proceso del desarrollo que se completa con una infraestructura mielinizada y estática del sistema nervioso que exhibe proporciones óptimas para la conducción rápida del potencial de acción. Hoy en día se sabe que esta estructura brinda también soporte mecánico y metabólico a los axones, regulando la reparación y plasticidad de los mismos (Dawson et al., 2003). La mielina contiene un 40% de agua y su materia seca consiste, a diferencia de la mayoría de las membranas plasmáticas del cuerpo, en un 70% de lípidos y un 30% de proteínas (Baumann & Pham-Dinh, 2001; K. A. Nave & Werner, 2014). En el SNC, las principales proteínas de la mielina son MBP y PLP, que contribuyen a la compactación de la mielina. A estas le siguen en menor porcentaje CNPasa, MAG y MOG (K. A. Nave & Werner, 2014). La CNPasa es una enzima asociada a la mielina que constituye el 4% de las proteínas de mielina total del SNC y es expresada por oligodendrocitos (Raasakka & Kursula, 2014). Esta enzima también se asocia a los microtúbulos y participa en la producción local de adenosina en lesiones traumáticas cerebrales. Asimismo, hay evidencias que CNPasa tiene acciones reguladoras sobre la permeabilización de la membrana mitocondrial (Raasakka & Kursula, 2014). Junto a otras proteínas de mielina del SNC, CNPasa es un autoantígeno en la esclerosis múltiple (Raasakka & Kursula, 2014). Asimismo, se han observado cambios en los niveles de expresión de CNPasa en la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y síndrome de catatonía-depresión (Raasakka & Kursula, 2014). Además, CNPasa es blanco de los neuroesteroides (Baulieu & Schumacher, 1997).

Se sabe, además, que la composición de proteínas en la mielina difiere sustancialmente entre el SNC y el periférico. Sin embargo, esto no sucede con las especies de lípidos, ya que estas son sumamente similares. Los lípidos cuantitativamente más importantes en la mielina son el colesterol, la galactosilceramida y el plasmalógeno de etanolamina. La bicapa de mielina contiene también diferentes glicolípidos, como galactocerebrósido, galactosulfátido y gangliósido (Brien, 1965; Gkikas et al., 2017).

El papel crucial de los lípidos en la fisiología tisular y la señalización celular se demuestra por los numerosos trastornos neurológicos y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Esclerosis Múltiple donde el cambio de la composición lipídica a causa de una desregulación del metabolismo conduce a una desestabilización y degradación de la mielina que ralentiza la conducción de impulsos eléctricos a lo largo de los nervios y conduce a la interrupción o pérdida de función (Dutta & Trapp, 2007; Schmitt et al., 2015; Wenk, 2005). Otro factor importante en la estabilidad de la mielina es la comunicación recíproca entre axones y oligodendrocitos ya que su deficiencia conduce a enfermedades neurológicas. Por ejemplo, en la Esclerosis Múltiple, la pérdida de esta comunicación debido a la muerte de los oligodendrocitos y la desmielinización lleva a una degeneración considerable de los axones y al desarrollo de astrogliosis (Dutta & Trapp, 2007; Lassmann et al., 2007).

### **Remielinización**

La remielinización es un proceso de gran importancia que se basa en la regeneración espontánea de mielina después de eventos desmielinizantes que tienen lugar en el SNC adulto. Implica una recapitulación parcial de los procesos de desarrollo debido a que es llevado a cabo por un subconjunto de precursores de oligodendrocitos distribuidos por todas las regiones del SNC que se mantienen indiferenciados desde el periodo postnatal temprano (S. P. Fancy et al., 2011). La remielinización implica las distintas etapas de activación, reclutamiento (proliferación y migración) y diferenciación de los progenitores en oligodendrocitos maduros formadores de vainas de mielina. Cada paso está orquestado por una red compleja de células y moléculas de señalización. Es de suma importancia que la remielinización sea rápida para que se pueda restaurar el apoyo metabólico al axón, evitando la degeneración y la posterior discapacidad neurológica. Es también importante para reconstruir los nodos de Ranvier, donde se encuentran los canales de sodio dependientes del voltaje necesarios para la conducción saltatoria (Rasband & Peles, 2015).

A diferencia de la mielinización, que se lleva a cabo durante el desarrollo, para la que existe una estrecha asociación entre el diámetro del axón y el grosor de la mielina, el grosor de la vaina de mielina durante la remielinización es independiente del diámetro del axón. Además, en la remielinización, las vainas de mielina son más delgadas y cortas que las originales generadas durante el desarrollo (Blakemore, 1974). Por otro lado, la eficacia de la remielinización disminuye progresivamente con el envejecimiento, un fenómeno que tiene una profunda influencia en la historia natural de enfermedades desmielinizantes crónicas como la esclerosis múltiple, aunque estudios experimentales han revelado que los efectos de la edad son reversibles (Franklin & French-Constant, 2017).

### **Esclerosis lateral amiotrófica**

La ELA, también conocida como enfermedad de la motoneurona, enfermedad de Charcot y enfermedad de Lou Gehrig, es una enfermedad neurodegenerativa común de inicio en la edad adulta que conduce a parálisis y muerte, por lo general dentro de los 2 a 5 años posteriores al diagnóstico. Fue descrita en 1869 por el neurobiólogo y médico francés Jean-Martin Charcot. El principal sello distintivo de esta enfermedad es la disfunción selectiva y la muerte de las neuronas de las vías motoras

que conduce a espasticidad, hiperreflexia (motoneuronas superiores), debilidad generalizada, atrofia muscular y parálisis (motoneuronas inferiores) (Mulder et al., 1986).

Existen dos formas de ELA: la principal es de origen esporádica, entre el 90-95%, y aproximadamente el 10% restante es de tipo familiar (ELAf), causada en un 20% de los casos por mutaciones en el gen de la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Sica & Dubrovsky, 2001). Esta distribución de enfermedades familiares y esporádicas es similar a otras enfermedades neurodegenerativas de aparición en adultos, como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Guegan et al., 2001). Excepto por las variantes atípicas de ELA, la forma familiar de la enfermedad es clínicamente indistinguible de los casos esporádicos.

La edad de aparición más frecuente de ambas formas de la enfermedad es entre los 50 y los 60 años. Los estudios epidemiológicos existentes de ELA indican variaciones en la prevalencia e incidencia de esta enfermedad en diferentes poblaciones, especialmente en términos de edad y sexo, sumado también a variaciones regionales y temporales. Según un estudio de metaanálisis realizado en 2020, se estimó la prevalencia e incidencia global bruta de ELA en 4,42 por 100.000 habitantes y 1,59 por 100.000 personas-año, respectivamente. La prevalencia e incidencia de ELA aumentan con la edad hasta los 70-79 años (Xu et al., 2020).

Los mecanismos exactos que subyacen a la degeneración selectiva de motoneuronas en la ELA aún se desconocen. La evidencia experimental demuestra que están involucrados factores como daño oxidativo, excitotoxicidad, apoptosis, función anormal de neurofilamentos, defectos en el transporte axonal, procesamiento y degradación de proteínas malformadas, aumento de la neuroinflamación y disfunción mitocondrial (Cleveland & Rothstein, 2001). La pérdida de motoneuronas se acompaña de gliosis reactiva (Leigh & Swash, 1991), anomalías del neurofilamento intracitoplasmático y esferoides axonales (Gonatas et al., 1992).

En la enfermedad en etapa terminal hay una pérdida significativa de fibras mielinizadas grandes en los tractos corticoespinales y raíces ventrales, así como evidencia de degeneración walleriana y atrofia de las fibras mielinizadas (Delisle & Carpenter, 1984). La falla de los músculos respiratorios es generalmente el evento fatal, que ocurre entre uno y cinco años después del inicio y conduce a la muerte de los pacientes por paro respiratorio.

## **Clínica de la ELA**

El diagnóstico clínico de ELA es extremadamente desafiante al principio del proceso de la enfermedad y se basa en un examen clínico cuidadoso, antecedentes de síntomas y progresión, baterías de pruebas de laboratorio, pruebas electrofisiológicas de los nervios motores inferiores y músculos y, a veces, estudios de imágenes y/o biopsia de tejido de nervioso o muscular para diferenciarlo de varias otras enfermedades con presentaciones clínicas similares. Establecer un diagnóstico es importante, ya que el pronóstico y los tratamientos son muy diferentes para la ELA y algunas de las enfermedades que pueden imitarla, como la miositis por cuerpos de inclusión, la poliomielitis, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, la neuropatía multifocal motora, neuropatía y enfermedad de Lyme, por nombrar algunas. La evaluación cuidadosa por parte de un

neurólogo experimentado es clave para diagnosticar ELA. La Federación Mundial de Neurología (WFN) ha desarrollado un algoritmo de diagnóstico que combina los hallazgos clínicos y, en algunos casos, electrofisiológicos. La presencia de signos de motoneurona superior e inferior en múltiples áreas del cuerpo sugiere un diagnóstico más probable de ELA. Los signos de motoneurona superior incluyen hiperreflexia, espasticidad, reflejo de Babinski y debilidad. Los signos de motoneurona inferior incluyen debilidad muscular, hiporreflexia y fasciculaciones musculares. (Zigmond et al., 2014)

## **Modelos animales ELA**

Hay muchos modelos animales que presentan degeneración de motoneuronas, que van desde la toxicidad crónica por aluminio en roedores hasta la atrofia muscular espinal en vacas. Debido a que cada uno de estos modelos puede proporcionar información nueva e importante sobre las motoneuronas, pueden ser relevantes para la ELA.

Un modelo de ratón transgénico descrito para la ELA<sub>f</sub> es el modelo con mutación en el gen que codifica para SOD1. Este modelo ha sido descrito por Gurney en la década del 90 (Gurney et al., 1994), y sobreexpresa la forma mutada de SOD 1 humana. Sólo representa los casos familiares con mutación de SOD1. Hay que tener en cuenta que la mayoría de las familias con ELA<sub>f</sub> (80%) no sufrirán ningún cambio en el gene SOD1 y, por lo tanto, una prueba del gen SOD1 normal no brinda demasiada información en una familia en la que no se haya identificado un cambio en el gene SOD1. Las mutaciones en el gen para SOD1 crean una nueva función que resulta tóxica para las motoneuronas (Jakob Maximilian Moser et al., 2013). Otros estudios sobre la funcionalidad de genes en regiones de cromosomas que previamente se ha relacionado con algunas formas de ELA<sub>f</sub> llevaron a la identificación de las mutaciones en los genes FUS y TARDBP (proteína TDP-43) (Mackenzie et al., 2010). Ambas mutaciones provocan la acumulación citoplasmática de proteínas malformadas en neuronas y células gliales de corteza cerebral, medula espinal y los tractos de sustancia blanca asociados a esta (Mackenzie et al., 2007).

## **El ratón Wobbler**

El ratón Wobbler fue descrito por primera vez por Falconer (Falconer, 1956). Se trata de un mutante espontáneo recesivo que presenta degeneración de las motoneuronas y es reconocido como modelo experimental para la forma esporádica de la ELA, como lo demuestran investigaciones en varios laboratorios (Bigini et al., 2012; Boillee et al., 2003; Dahlke et al., 2015; M. C. Gonzalez Deniselle et al., 2012; Ikeda & Iwasaki, 2015; J. Y. Lee et al., 2015; Ratliff et al., 2018; Thielsen et al., 2013). La mutación Wobbler corresponde a un intercambio de un solo par de bases en el último exón del gen Vps54 (vacuolar protein sorting 54 o complejo de proteínas vacuolares asociadas al trans-Golgi), que conlleva al intercambio de un aminoácido de leucina por uno de glutamina (L967Q) en el dominio C-terminal de la proteína Vps54. Vps54 es una de las cuatro subunidades del complejo de proteína retrógrada asociada a Golgi (GARP). El complejo GARP participa en el transporte de vesículas retrógradas desde los endosomas a la red trans-Golgi, de modo que la mutación y, en consecuencia,

el déficit de estabilidad provoca un transporte de vesículas retrógradas deficiente y estructuras endosómicas agrandadas en las motoneuronas en degeneración (Palmisano et al., 2011) de la médula espinal cervical y corteza motora. Asimismo, hay incremento de los procesos de estrés oxidativo que conducen a niveles elevados de óxido nítrico (NO) intramitocondrial. El aumento de NO desencadena la inhibición de la cadena respiratoria y es responsable de la mitocondriopatía del Wobbler (Thielsen et al., 2013) (M. C. Gonzalez Deniselle et al., 2012). La disfunción mitocondrial también juega un papel fundamental en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas además de la ELA, tales como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Cozzolino & Carri, 2012; Hattingen et al., 2009; Johri & Beal, 2012; Niedzielska et al., 2016).

Tanto el fenotipo macroscópico de Wobbler como el celular solo se desarrolla en ratones mutantes homocigóticos (wr/wr) mientras que los ratones heterocigotos (wr/+) no muestran ningún signo patognomónico de la enfermedad. El ratón Wobbler (wr/wr) no muestra anomalías clínicas durante las tres primeras semanas posteriores al nacimiento y no hay una diferencia significativa en lo que respecta al peso corporal, fuerza de agarre y pruebas motrices. En la fase evolutiva de desarrollo, que dura desde la tercera semana hasta el tercer mes de edad, los ratones wobbler homocigotos muestran un desarrollo progresivo de síntomas clínicos. En la cuarta semana, los ratones wr/wr son aproximadamente un 40-50% más pequeños que los controles (+/+). Pasados los dos meses de edad ingresan en la etapa sintomática donde las extremidades traseras generalmente permanecen menos afectadas y la debilidad de las extremidades anteriores y los músculos de la cabeza y cuello empeora rápidamente hasta la duodécima semana. Durante este período, el temblor de la cabeza aumenta severamente, la marcha es inestable y tambaleante es muy pronunciada y los ratones no pueden usar sus patas delanteras para mantener el agarre en una grilla. Finalmente, la muerte se produce por insuficiencia respiratoria causada por la degeneración de las neuronas motoras que inervan el diafragma. La esperanza de vida del Wobbler varía dependiendo del progreso de los síntomas, algunos ratones afectados viven más de un año, con un promedio estimado de 16 meses. Esta clasificación y evolución de los síntomas se encuentra basada en una primera descripción de Duchén (Duchén & Strich, 1968).

## **Hormonas esteroideas**

Las diversas hormonas esteroideas comparten una misma molécula precursora: el colesterol. La transformación del colesterol ocurre en las glándulas endócrinas, la placenta y en el sistema nervioso, el que cuenta con toda la maquinaria enzimática para la síntesis de varios esteroides. Dentro del grupo de tejidos donde se sintetizan las hormonas esteroideas se encuentra la corteza suprarrenal que produce cortisol (la principal hormona glucocorticoide en humanos) o corticosterona (principal glucocorticoide en roedores), aldosterona (la principal hormona mineralocorticoidea) y andrógenos. Las gónadas producen estrógenos y progesterona (ovario) o testosterona (testículo). En cada caso, la producción de hormonas esteroideas es regulada por hormonas tróficas liberadas por la glándula pituitaria.

Las células que producen los esteroides pueden utilizar, como materia prima para su síntesis el colesterol que se encuentra circulando por la sangre asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Alternativamente, las células pueden sintetizar colesterol de novo que se sintetiza a partir de acetil-CoA. En los humanos, aproximadamente el 80% del LDL colesterol es empleado para la síntesis de esteroides. El núcleo de colesterol, ya sea sintetizado de novo o endocitado, ingresa a la mitocondria por acción de la StAR (proteína de regulación aguda de la esteroideogénesis) para la formación de pregnenolona, el precursor común de todas las hormonas esteroideas (Figura 3). La pregnenolona se convierte en progesterona por la 3 beta ol-deshidrogenasa/isomerasa (HSD<sub>3B2</sub>), la cual por varios pasos metabólicos se convierte en aldosterona por la zona glomerular de la glándula suprarrenal, en cortisol en humanos o corticosterona en roedores por la zona fasciculada. En ovario, la pregnenolona se metaboliza a progesterona y androstenediona, para luego formar estradiol. En las células de Leydig del testículo la progesterona se metaboliza en testosterona. Este último también secreta androstenediona la cual puede ser convertida a testosterona por la enzima 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD<sub>17b1</sub>) de tejidos periféricos. La testosterona actúa los tejidos a través del receptor androgénico clásico (AR). En la próstata, por ejemplo, se convierte en tejido blanco como la próstata a dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -DHT) por acción de la enzima 5 alfa-reductasa. Por lo menos dos proteínas distintas, codificadas por dos genes diferentes, 5 alfa reductasa tipo 1 y tipo 2, catalizan la conversión de testosterona a 5 $\alpha$ -DHT en el hígado, próstata, piel y SNC (Boulpaep, 2016) (Ghoumari et al., 2020).

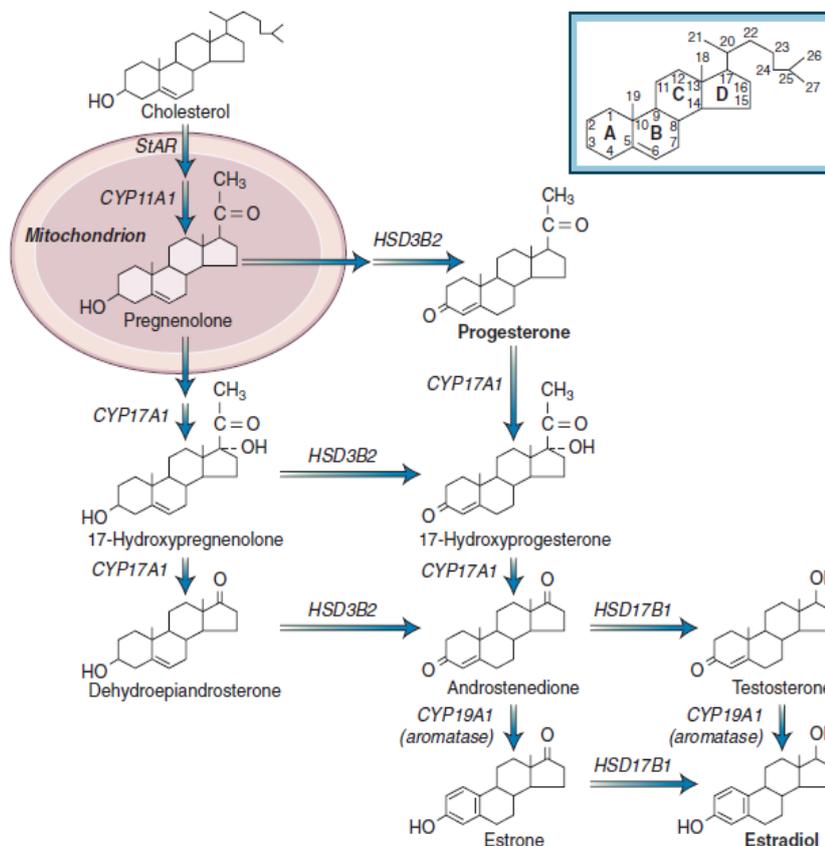


Figura 3. Esquema de la ruta biosintética de esteroides neuroactivos a partir del colesterol.

## Neuroesteroides

Los neuroesteroides, según la denominación de Baulieu, son hormonas esteroideas sintetizadas en el SNC y periférico, ya sea de novo a partir del colesterol, o a partir de precursores plasmáticos, es decir que acceden al SNC a través de la barrera hemato-encefálica. Los neuroesteroides tienen acción autócrina o parácrina en el sistema nervioso, independientemente de la concentración sérica de las hormonas esteroideas secretadas por las glándulas endocrinas. Algunos de los esteroides que se encuentran dentro de esta clasificación son la pregnenolona, dehidroepiandrosterona y progesterona (Baulieu, 1997). Lo interesante de este tema es que los neuroesteroides persisten en el sistema nervioso luego de remover quirúrgicamente a las gónadas o suprarrenales, lo cual evidencia que se sintetizan localmente por las distintas células del sistema nervioso.

## Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas

A nivel del organismo, las hormonas esteroideas son ampliamente reconocidas por su generación de una amplia gama de respuestas celulares y fisiológicas esenciales, como resultado de su producción endocrina y su posterior funcionamiento como mensajeros químicos en todos los dominios de sus sistemas endócrinos. Dichos efectos biológicos de las hormonas esteroideas son transducidos por receptores intracelulares que median directamente la acción de su hormona afín a ellos (Evans, 1988).

Los receptores de hormonas esteroideas (SHR) fueron los primeros miembros reconocidos de la superfamilia de receptores nucleares de esteroides / tiroideos / retinoides, una clase de factores de transcripción cuya actividad está regulada por pequeñas moléculas liposolubles. El subgrupo SHR incluye receptores de estradiol (receptor de estrógeno  $\alpha$  y  $\beta$  - ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), cortisol (receptor de glucocorticoides - GR), aldosterona (receptor de mineralocorticoides - MR, progesterona (PR) y testosterona (receptor de andrógenos - AR).

En lo que respecta al mecanismo de acción, en una primera instancia las hormonas esteroideas ingresan a las células blanco por difusión simple a través de la membrana plasmática. Una vez dentro de la célula, la hormona se une con alta afinidad a un receptor proteico localizado en el citosol o el núcleo. La unión del esteroide a su receptor resulta en un cambio conformacional que activa al complejo receptor-hormona y adquiere en el núcleo afinidad por una secuencia corta de ADN llamada elemento respondedor a hormonas (HRE) que actúa en cis ubicada dentro de los promotores y / o potenciadores de genes diana, permitiéndole así modular selectivamente la expresión génica de igual manera que los factores de transcripción (Pettersson et al., 1997). Las hormonas esteroideas, también pueden actuar a través de receptores de membrana, lo que se ha descrito como mecanismo no clásico o no genómico

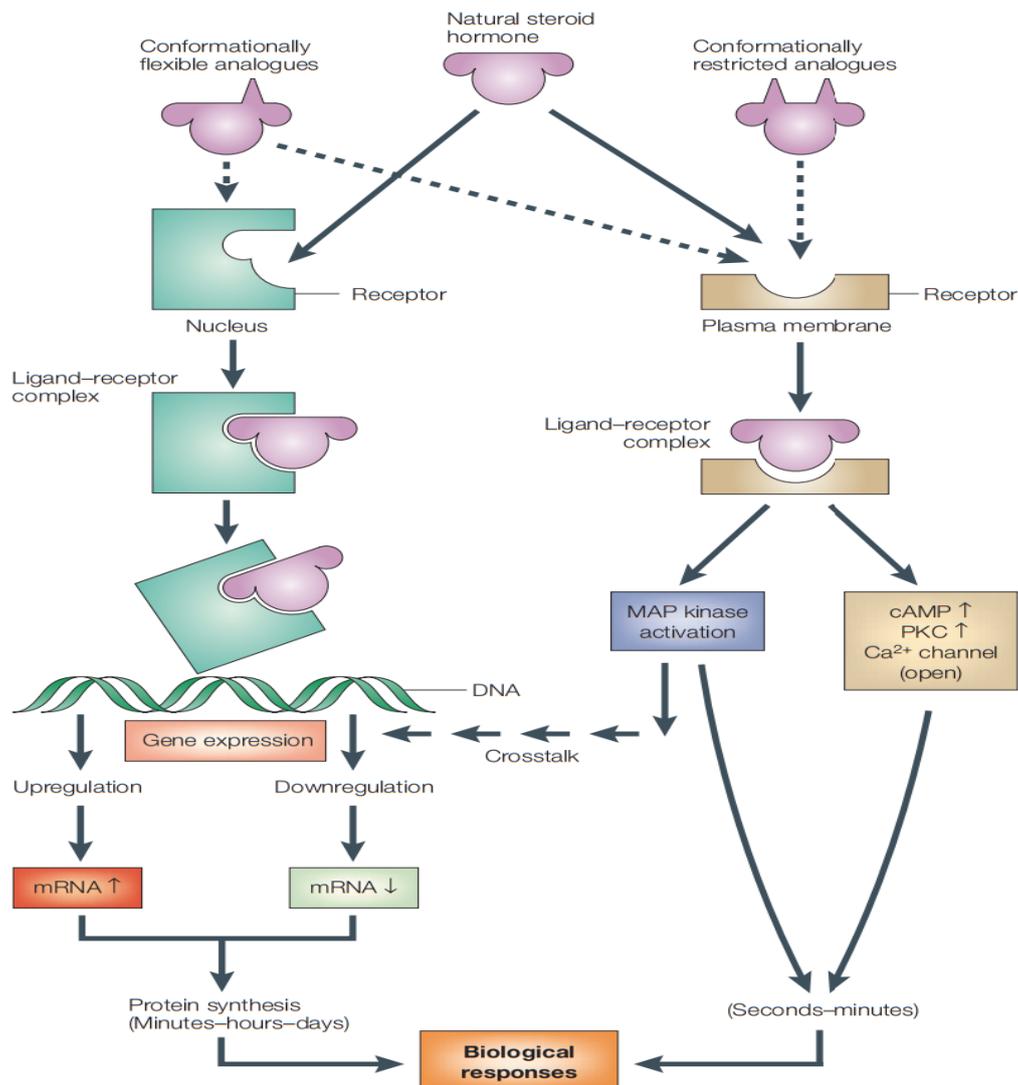


Figura 4. Esta figura muestra la vía genómica (lado izquierdo). En este caso, la ocupación del receptor nuclear por su ligando específico conduce a una regulación positiva o negativa de los genes sujetos a la regulación del receptor hormonal. En la vía de respuesta rápida (lado derecho), la ocupación de un receptor de membrana putativo (que en algunos casos podría ser un receptor nuclear asociado a la membrana) por la hormona esteroide puede conducir al inicio de respuestas rápidas que se acoplan a través de sistemas de segundos mensajeros, ya sea directamente para la generación de la respuesta o respuestas biológicas finales o indirectamente a través de la modulación de las respuestas genómicas (Norman et al., 2004).

## Testosterona

La testosterona (T) es una hormona esteroidea gonadal que posee efectos en diferentes tejidos, incluido el cerebro. Sumado a su función reproductiva esta hormona es responsable del incremento de la masa muscular, la función sexual y la libido, el vello corporal y la disminución del riesgo de osteoporosis (Kevorkian & Morley, 2003; Rosch, 1995). Los patrones de conducta y morfología específicas de cada sexo son determinados por la presencia o ausencia de esta hormona durante ciertos periodos críticos del desarrollo del SNC (Day et al., 1998). La testosterona es secretada en

forma fisiológica por los testículos y es transportada por la globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG) en un 60-70%, mientras que el 30-40% restante está unido a albumina, sólo el 0.5-2% de la testosterona se encuentra libre (Iqbal et al., 1983). Además, las glándulas suprarrenales contribuyen a la formación de testosterona periférica secretando su precursor dehidroepiandrosterona (DHEA). Entre el hombre y la mujer existe una diferencia en las concentraciones de SHBG que influye en la testosterona circulante (Hadwin, 1993). El nivel de SHBG aumenta con la pubertad, mostrando su pico alrededor de los 16-18 años en hombres. Por lo tanto, el nivel de testosterona libre con capacidad de ingresar a los tejidos está disminuido y llega a sus niveles más bajos en hombres por encima de los 60 años (Leifke et al., 2000).

### **Metabolismo de la testosterona y mecanismos de acción**

En el tejido nervioso, los efectos biológicos de la testosterona están mediados a través del receptor de andrógenos (AR). La regulación de la proteína de AR y/o el ARNm del AR por andrógenos fue observada en mamíferos en múltiples tejidos respondedores a andrógenos, como el cerebro (Burgess & Handa, 1993), próstata (Kumar et al., 1997), testículos (Blok et al., 1992), ovario (Tetsuka & Hillier, 1996) y glándulas suprarrenales (Bentvelsen et al., 1996). Este receptor ha sido localizado principalmente en neuronas y astrocitos, y, además, demostraron ser fuertemente regulados en células de microglía en respuesta a lesiones (DonCarlos et al., 2006).

Los efectos de la testosterona en el sistema nervioso están mediados por la unión directa de este esteroide o después de su conversión a través de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa al andrógeno no aromatizable 5 $\alpha$ -DHT, que se une al AR con mayor potencia que la testosterona. La 5 $\alpha$ -DHT se puede metabolizar en 1) 5 $\alpha$ -androstane, 3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol (3 $\beta$ -Diol, también conocido como 3 $\beta$ -androstane diol o 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ -tetrahidrotestosterona (3 $\beta$ , 5 $\alpha$ -THT) y 2) 5 $\alpha$ -androstane 3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol (3 $\alpha$ -Diol, también conocido como 3 $\alpha$ -androstane diol o 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THT), metabolitos de 5 $\alpha$ -DHT que tienen poca actividad sobre el AR. El metabolito de testosterona 3 $\alpha$ -androstane diol es un modulador alostérico positivo del receptor GABA<sub>A</sub>. En cuanto al 3 $\beta$ -androstane diol, tiene una capacidad moderada para unirse y estimular el receptor de estrógenos (ER) beta. ER también media los efectos de la testosterona después de su conversión en estradiol por la enzima aromatasa. Además, parte de sus acciones pueden ser mediadas por la unión al receptor Sigma-1, una chaperona ubicada en la membrana mitocondrial asociada al retículo endoplásmico (MAM) (Brocca & Garcia-Segura, 2019; Hussain et al., 2013). La Figura 5 muestra los metabolitos, enzimas y receptores de esteroides implicados en la acción de la testosterona en el sistema nervioso.

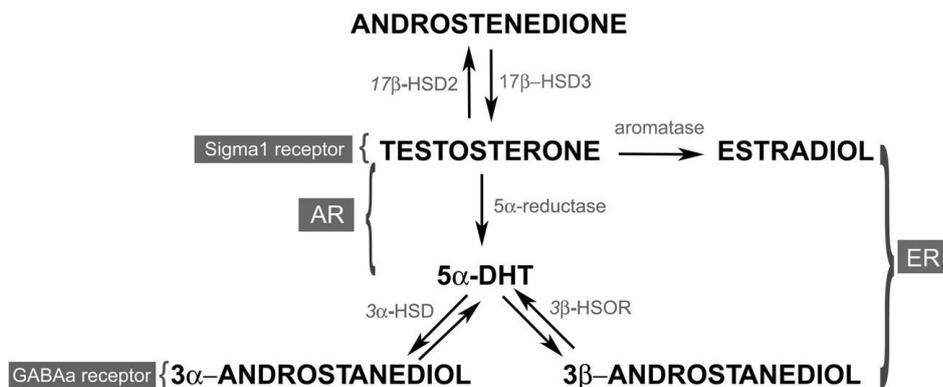


Figura 5. Vías, enzimas y receptores implicados en el metabolismo y la acción de la testosterona en el sistema nervioso. Enzimas incluidas: 17β-HSD (17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa), 5α-reductasa, 3α-HSD (3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa), 3β-HSOR (3β- hidroxiesteroide oxidorreductasa), aromatasa.

Una de las funciones menos estudiadas de la testosterona es la neuroprotección. Por definición, es un efecto que resulta en recuperar o regenerar el SNC, sus células, su estructura y su función. La testosterona, como un agente endógeno, podría en su forma libre cruzar la barrera hematoencefálica (Iqbal et al., 1983) e influenciar las células neuronales donde podría actuar directamente a través de la vía androgénica, o de forma indirecta vía conversión a estrógenos o derivados reducidos. Para distinguir la neuroprotección androgénica de la estrogénica, Pike y col. (Pike, 1999) han estudiado si la protección de testosterona puede ser inhibida por Droloxifeno, un antagonista del receptor de estrógenos. Estos autores observaron que la neuroprotección brindada por la testosterona no fue reducida por el antagonista. Sin embargo, existe la posibilidad que el andrógeno actúe tanto vía AR como vía ER luego de su conversión a estrógenos. Por ejemplo, ambos AR y ER están implicados en la reducción del beta-amiloide por testosterona, mientras que solamente AR media la acción de la testosterona sobre la densidad de las espinas dendríticas. También se estudió si la neuroprotección se ve afectada por el antiandrógeno flutamida (Pike, 2001). Este compuesto antagoniza las acciones genómicas por bloqueo del AR, pero podría fallar en bloquear algunos efectos no genómicos del AR. Además, algunas observaciones sugieren que la flutamida, y otros anti andrógenos, no solo fallan en bloquear las acciones del AR dependiente de testosterona, sino que también los mimetizan (Peterziel et al., 1999).

Se han demostrado algunos efectos protectores de los andrógenos en los modelos de ELA y otras afecciones patológicas. Por ejemplo, el tratamiento de ratones transgénicos SOD1-G93A con 5α-DHT, muestra efectos benéficos, retardando la progresión de la enfermedad (Yoo & Ko, 2012). En otras patologías del SNC, como en la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica, desmielinización inducida por cuprizona, desmielinización de la medula espinal inducida por lisolecitina, lesión de medula espinal y enfermedad de Alzheimer, los andrógenos también proporcionan neuroprotección, aumentan la remielinización y ejercen efectos antiinflamatorios (Hussain et al., 2013; Silvia et al., 2012). Por lo tanto, la evidencia acumulada de diferentes fuentes justifica una mayor investigación sobre el valor potencial de los andrógenos para las enfermedades neurodegenerativas

## Antecedentes

Los resultados preliminares realizados en el laboratorio apoyan que la testosterona ejerce efectos protectores sobre neuronas con atenuación de la vacuolización neuronal y actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en la médula espinal del ratón Wobbler.

Los ratones Wobbler presentan una mutación espontánea del gen que codifica la proteína de transporte Vps 54, responsable del transporte retrógrado de los endosomas al trans-Golgi (J. M. Moser et al., 2013). Los Wobbler presentan degeneración vacuolar de las motoneuronas, hiperreactividad glial e hipogonadismo (Ghoumari et al., 2020; H. Jockusch et al., 2014).

Los Wobblers machos muestran niveles reducidos de testosterona en plasma, cerebro, médula espinal y testículos, así como de androstenediona y su metabolito 5 $\alpha$ -DHT (Schmitt-John, 2015). En cambio, otros esteroides como la corticosterona y la desoxicorticosterona aumentan en la sangre y el sistema nervioso. Los cambios de andrógenos se asocian a niveles bajos de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y hormona luteinizante (LH), lo que demuestra desregulación en todos los niveles del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG). Estos cambios producen defectos en la espermiogénesis y la esterilidad (M. C. Gonzalez Deniselle et al., 2016). También se informa una reducción en los niveles de testosterona en pacientes con ELA de ambos sexos, lo que sugiere la participación de andrógenos en los mecanismos de la enfermedad. Además, varios estudios apuntan a una relación entre las disfunciones en la señalización de andrógenos y la degeneración de las motoneuronas. Es el caso de la atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA) o enfermedad de Kennedy, una patología genética debida a una mutación en el gen del AR, que muestra signos de síndrome de insensibilidad androgénica total o parcial (CAIS o PAIS) y se caracteriza por degeneración de motoneuronas. y anomalías endocrinas. Aunque los efectos beneficiosos de la testosterona no se han informado hasta ahora en ratones Wobbler, la administración de 5 $\alpha$ -DHT al modelo de ALS de ratones transgénicos SOD1G93A muestra efectos neuroprotectores y miotróficos (Meyer et al., 2017). En relación al ratón Wobbler, los axones se encuentran severamente desmielinizados (Duchen & Strich, 1968). Trabajos previos demuestran que la testosterona induce los genes de la mielina en oligodendrocitos en cultivo (Ghoumari et al., 2020), sugiriendo que este andrógeno podría también aumentar la mielinogénesis de la médula espinal.

## Objetivo general

El objetivo general de la presente investigación fue dilucidar si el tratamiento con testosterona exógena posee acción protectora sobre las células oligodendrogliales, astrogliales y sobre las vainas de mielina en un modelo de degeneración de motoneuronas, el ratón mutante Wobbler.

## Objetivos específicos

- Estudiar la acción de la testosterona sobre los oligodendrocitos maduros y proteínas de mielina en un modelo de degeneración de motoneuronas.
- Estudiar las características de las vainas de mielina y la relación mielina/axón en cortes semifinos de médula espinal cervical, sector FVL.
- Estudiar in vivo el papel de los andrógenos en la reactividad astrocitaria y expresión de factores inflamatorios en la neurodegeneración.
- Investigar la concentración de los metabolitos de testosterona en médula espinal cervical de ratones controles y Wobbler con o sin tratamiento con testosterona.
- Estudiar la expresión del receptor AR a nivel de ARNm en los distintos grupos experimentales.
- Estudiar los efectos de testosterona sobre parámetros de evolución clínica y sobre el trofismo muscular.

## Hipótesis de trabajo

Nuestra hipótesis de trabajo estuvo basada en demostrar si el tratamiento con testosterona exógena en un modelo de enfermedad de motoneurona era capaz de ejercer acciones antiinflamatorias y mielinizantes a través de la regulación de las células astrogliales y oligodendrogliales

## Materiales y métodos

### Animales experimentales

Grupos experimentales: Se utilizaron ratones controles de la cepa NFR/NFR y ratones con mutación Wobbler (wr/wr) de 2 meses de edad en periodo sintomático temprano con y sin tratamiento con testosterona cristalina. Se utilizaron solamente ratones machos en todos los experimentos.

Ratones Wobbler: Ratones heterocigotas NFR/wr obtenidos del National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, se crían actualmente en el bioterio del IBYME, el cual dispone de racks ventilados. Los ratones homocigotos wr/wr se emplearon a los 60 días de vida. A los 21 días, aparecen los signos clínicos. Se emplearon ratones Wr (wr/wr) y controles (NFR/NFR). Cada ratón fue identificado por su genotipo wr/wr usando un protocolo validado que emplea el polimorfismo de restricción Alu I de un producto de amplificación Cct4. Mediante un estudio de electroforesis en gel de agarosa el perfil de bandas de los fragmentos de restricción de ADN permitió detectar el estado alélico en el locus wr (Rathke-Hartlieb et al., 1999).

### Tratamiento esteroide

El tratamiento consistió en una única administración de testosterona cristalina (Sigma) colocada en tubos silásticos de 10mm de diámetro, los cuales permiten una liberación paulatina durante un periodo de 60 días. Los animales sin tratamiento esteroide recibieron tubos silásticos vacíos. Los tubos de silastic se preparan en el laboratorio siguiendo la técnica aplicada por el Dr Michael Schumacher (INSERM, Paris, Francia). Antes de realizar el implante en los animales de experimentación, los tubos silásticos rellenos con testosterona o vacíos se sumergieron en alcohol 70% y luego, en solución salina 0.9%.



Figura 6. Tubo silastic cargado con testosterona cristalina. Barra de escala: 10mm.

Grupos experimentales y tratamiento: 1) Controles y Wobbler que recibieron tubos silásticos vacíos, 2) Controles y Wobbler tratados con tubos silásticos rellenos de testosterona cristalina.

## Determinación de parámetros clínicos y nivel funcional

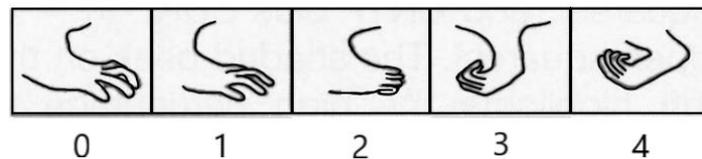
Grados clínicos: Se evaluaron los grados clínicos de los miembros anteriores de Wobbler acuerdo a la siguiente clasificación:

Grado I: menor peso, dígitos atróficos.

Grado II: temblor, dificultad ambulatoria, menor fuerza muscular y dígitos muy curvados.

Grado III: atrofia severa de miembros anteriores, flexión de muñeca.

Grado IV: flexión del miembro anterior hacia el pecho.



Fuerza muscular: Se evaluó la fuerza muscular de miembros anteriores a través de la cuantificación del tiempo en segundos que permanece un animal en una grilla vertical en situación antigravitatoria (Maria Claudia Gonzalez Deniselle et al., 2005).

Estudios a nivel del músculo bíceps: **i)** Se determinó el peso del músculo bíceps en el momento de la extracción con el objeto de apreciar atrofia o hipotrofia muscular (Mitsumoto et al., 1994). **ii)** Estudio del diámetro de las fibras musculares: Los músculos bíceps se obtuvieron por disección una vez perfundidos los animales con solución salina y luego paraformaldehído (PFA) 4%. Luego, se postfijaron en el mismo fijador por 2hs 30 minutos en flotación fijándose los extremos de la muestra. Luego se colocaron en alcohol 70% hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes transversales de 5µm en microtomo y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se obtuvieron imágenes, las cuales se analizaron con el software Optimas 6.02 a fin de analizar el diámetro mayor de las fibras.

## Tinción Luxol Fast Blue (LFB)

Secciones de parafina fueron tratadas con etanol 95% y sumergidas en solución LFB (0.1mg Luxol Fast Blue en etanol 95% con ácido acético 10%) a 60°C por 18 hs. Luego, las secciones fueron tratadas con carbonato de litio, etanol 70%, agua destilada, secadas y montadas con Permount. Cuantificamos el % de área teñida sobre un umbral en sustancia blanca.

## Técnicas Inmunohistoquímicas e Inmunofluorescencia

El empleo de anticuerpos anti-MBP (Abcam) y anti-CNPasa (Sigma-Aldrich) permitió la cuantificación por análisis computarizado de imágenes (Optimas VI) de la intensidad de inmunoreacción del tracto corticoespinal (CST) (axones motores descendentes) y el funículo ventrolateral (FVL). La tinción de FVL muestra la respuesta de las raíces ventrales originadas en las motoneuronas.

Inmunohistoquímica para MBP y CC1: Las secciones de tejido utilizadas en estas técnicas se obtuvieron por medio de un microtomo (5µm). Fueron desparafinadas y lavadas en buffer fosfato 0,01

M que contenía NaCl 0,14 M (PBS) y luego sumergidas en metanol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3% por 30 minutos a temperatura ambiente para el bloqueo de peroxidasas endógenas. Después de la preincubación en albúmina de suero bovino (BSA) al 5% para MBP, suero de cabra al 10% para CC1 durante 10 min a 37 ° C, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios anti-MBP 1:1000 (Abcam) y 3 noches a 4°C con anti-CC1 1:75 (Sigma-Calbiochem). A continuación, las secciones se lavaron, se incubaron con los anticuerpos biotinilados secundarios por 60 minutos a temperatura ambiente y se procesaron de acuerdo con las instrucciones del kit ABC (Vector Labs, CA, EE.UU.). La actividad peroxidasa se reveló usando tetracloruro de diaminobencidina (DAB, 0,25 mg/ml, SIGMA, St. Louis, MO) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01% durante 7 min en oscuridad. Después de un enjuague final en PBS, las secciones se deshidrataron en etanol y xileno y se cubrieron con medio de montaje (Permount). La inmunorreactividad para MBP y CC1 se analizó en imágenes obtenidas con un sistema computarizado adosado al microscopio óptico Olympus. Las imágenes se obtuvieron con la misma iluminación.

Inmunohistoquímica para GFAP: Esta proteína de filamentos intermedios caracteriza a los astrocitos reactivos marcando sus procesos. Secciones de medula espinal de 5µm de espesor obtenidas en micrótopo, fueron tratadas durante 30 min con metanol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% para el bloqueo de peroxidasas endógenas y luego incubadas durante una noche a 4°C con el anticuerpo primario policlonal anti-GFAP (Dako). Luego de un lavado se incubó nuevamente con el anticuerpo secundario durante 60min y la actividad fue revelada mediante el kit de Vectastain ABC Elite. Los datos se obtuvieron por un sistema computarizado de análisis (intensidad de la inmunoreacción ± SEM) (M. Meyer et al., 2010). El número de células GFAP+ fue cuantificado en la región del asta ventral de la sustancia gris y expresado en número/área utilizando el sistema de análisis de imágenes Optimas 6.02, a través de la cuantificación solamente de aquellas células que presentaban su núcleo visible. El análisis cuantitativo de las células inmunorreactivas se llevó a cabo cada 6 secciones a lo largo de la médula espinal cervical (desde el nivel C2 hasta el nivel C6) (Maria Meyer et al., 2010; Meyer et al., 2012). Se capturaron imágenes digitales de secciones teñidas con DAB con la misma intensidad de luz y tiempo de exposición. La inmunoreacción de DAB se analizó utilizando el software Optimas (Bioscan Optimas 6.02, EE. UU.)

Glutamina sintetasa: Se han demostrado una población de astrocitos GS positiva y otra negativa in vivo en el SNC de Wobbler (Blondet et al., 1995);(Meyer et al., 2012). Por lo tanto, el estudio del efecto de testosterona en Wobbler mostraría si este esteroide era capaz de regular la incapacidad del astrocito para atrapar y convertir el exceso de glutamato en glutamina, reduciendo la neurotoxicidad del glutamato. Por ello, fue muy importante demostrar que la testosterona restaurase la capacidad del astrocito para expresar GS. Se determinó mediante inmunohistoquímica, empleando una dilución 1/200 del anticuerpo monoclonal anti-GS (BD Biosciences). El segundo anticuerpo fue un anti-ratón hecho en cabra conjugado con biotina, a una dilución 1/200 (Vector M.O.M. Kit de inmunodetección), procesándose las secciones de acuerdo al kit ABC (Vector Labs, CA, USA) (M. Meyer et al., 2010).

Colocalización Glutamina Sintetasa/CNPasa y Glutamina Sintetasa/GFAP: Para dilucidar en que tipo celular se estaba expresando la enzima GS se estudió mediante inmunofluorescencia de doble

marcación la colocalización de GS con el marcador astrocitario GFAP y GS con el marcador de oligodendrocitos CNPasa. Para localizar la enzima GS en oligodendrocitos, secciones de médula espinal fueron desparafinadas, lavadas con PBS y tratadas con buffer citrato a 80°C durante 30 min para la recuperación antigénica. El paso siguiente fue el bloqueo de las muestras con albúmina de suero bovino (BSA) 2% por 10 min a 37°C. Una vez pretratadas las muestras fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GS (dilución 1/200) junto al anticuerpo policlonal de conejo anti-CNPasa (dilución 1/200). Luego de realizar lavados en PBS, se realizó la incubación con los segundos anticuerpos anti-ratón Alexa Rojo 555 (1/1000, reaccionando con Ac anti-GS) y anti-conejo Alexa Verde 488 (1/1000, reaccionando con Ac anti-CNPasa) para la posterior detección. Para la colocalización GS/GFAP, se realizó un procedimiento similar al antes mencionado para GS/CNPasa. El anticuerpo primario utilizado en este caso fue un anticuerpo policlonal anti-GFAP hecho en conejo (Dako, dilución 1/500) seguido por el anti-conejo hecho en cabra Alexa Verde 488 (1/1000). En ambos casos, las secciones fueron lavadas y montadas con Fluoromount-G (Southern Biotech). La inmunofluorescencia se examinó con un microscopio invertido Olympus IX83 equipado con una unidad de rotación de discos (DSU, Olympus Corporation, Japón). Las imágenes digitales se adquirieron utilizando el software Cell Sens Dimensions de Olympus y se fotografiaron con una cámara monocromática Hamamatsu Orca Flash 4.0 (Hamamatsu Photonics K.K, Japón). Las imágenes inmunofluorescentes se analizaron utilizando el software Image J (NIH, MD, EE. UU.) (Maria Meyer et al., 2010; Meyer et al., 2012). Se ajustó el tiempo de exposición para adquirir imágenes fluorescentes por debajo del nivel de saturación para la señal de inmunofluorescencia más alta y esta condición se mantuvo en todas las muestras.

### **Técnica de cortes semifinos y tinción con azul de toluidina**

Los ratones fueron perfundidos con PBS 0,1 M seguido de solución de paraformaldehído al 2% / glutaraldehído al 2% (n = 3-4 / grupo). Se extrajeron las médulas espinales cervicales y se dividió un segmento de tejido de 1 cm centrado en raíces ventrales y en FVL de 1 mm. Esta pieza de 1mm fue procesada para la inclusión en Durcupan (FlukaChemic AG, Sweden) como se describió anteriormente (M. C. Gonzalez Deniselle et al., 2002). Se cortaron las secciones semifinos a 1 µm en una orientación transversal en un ultramicrotomo (Ultracut MZ6; Leica Microsystems). Las secciones fueron teñidas con azul de toluidina al 2% y se cubrieron con cubreobjetos. En estos cortes semifinos, se determinó la integridad / mielinización del axón y las mediciones de la relación g. Usando un objetivo de inmersión en aceite Zeiss 100 X, se adquirieron sistemáticamente nueve imágenes centradas uniformemente alrededor del asta ventral de cada sección. Se centró un rectángulo (que cubre ~1/3 de cada imagen) sobre la imagen y todos los axones dentro de este rectángulo fueron clasificados como "desnudos", "patológicos" o "mielinizados". El diámetro del axón y el grosor de la mielina se calcularon a partir del área medida basándose en el supuesto de circularidad utilizando Fiji / ImageJ (Fiji.sc) ( $\text{diámetro} = 2 \times \sqrt{[\text{área} / \pi]}$ ), con un mínimo de 100 axones [por animal analizado]. En el análisis de la relación g del espesor de la mielina se calculó restando el diámetro de la capa de mielina compacta más interna del diámetro de la capa de mielina compacta más externa. Los axones no circulares (de forma oblonga) se excluyeron de los recuentos. Las proporciones g se analizaron utilizando un ANOVA de 2 vías de

medidas repetidas y una prueba post hoc de Bonferroni, donde se informó la significancia cuando  $p < 0,05$ . Las pendientes del grosor de la mielina frente al diámetro del axón se compararon mediante la prueba F de suma extra de cuadrados. Las distribuciones de la curva de la proporción de axones mielinizados por diámetro de axón se compararon mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

### Técnicas de RT-PCR en tiempo real

Determinación del ARNm para la proteína de mielina MBP: Se amplificó el cDNA retrotranscrito a partir del ARN de las muestras, utilizando SYBR Green Supermix (BioRad) y el aparato CFX96™ Touch real-time PCR que disponemos en el IBYME. El gen de la ciclofilina se utilizó como estándar interno basándonos en la similaridad de expresión entre las muestras. La cuantificación de la expresión relativa de los mensajeros fue realizada mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta ct}$  (Rathke-Hartlieb et al., 1999) y se expresa como porcentaje de inducción respecto a los animales controles. El listado de primers utilizados en la cuantificación por medio de RT-PCR en tiempo real para los ARNm de las proteínas de mielina se muestran en Tabla 1.

Factores inflamatorios: Se siguió la evolución de varios parámetros, tales como indicadores de reactividad y proliferación astrocitaria. Se realizó RT-PCR en tiempo real para la determinación de los factores inflamatorios y antiinflamatorios:  $TNF\alpha$ , TLR4,  $TGF\beta 1$ , y de la enzima glutamina sintetasa (GS). El método seguido se ha descrito en el apartado anterior. Las secuencias de primers utilizadas se encuentran en la Tabla 1.

Gen	Acces. num.	Primer forward (5' → 3')	Primer reverse (5' → 3')
$TNF\alpha$	NM_008401	AAACCACAGTCCCGCAGAGA	CGGATCATGCTTTCTGTGCTC
TLR4	NM_013693	GAAAAGCAAGCAGCCAACCA	TCTGATCCATGCATTGGTAGGT
$TGF\beta 1$	NM_000660	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	GGTTCATGTCATGGATGGTGC
MBP	NM_001025100	ATCCAAGTACCTGGCCACAG	CCTGTCACCGCTAAAGAAGC
$ER\alpha$	NM_001302532.1	GATCCCACCATGCACAGTGA	GGAGCATCTACAGGAACACAGGTA
5 $\alpha$ -reductase	NM_175283	TGTTTCCTGACAGGCTTTGCC	CCATGCCCACTAACCACAGGG
Ciclofilina b	NM_001025612	GTGGCAAGATCGAAGTGGAGAAAC	TAAAAATCAGGCCTGTGGAATGTG

Tabla 1. Secuencias de primers utilizados en la técnica de RT-PCR en tiempo real.

### Cromatografía gaseosa / espectrometría de masas (GC/MS)

Los animales se sacrificaron por decapitación y se extrajeron las médulas cervicales a fin de realizar la determinación de esteroides circulantes y aquellos expresados por el tejido. En este procedimiento analítico, los esteroides se extrajeron de los tejidos con metanol/ $CHCl_3$ , paso seguido de una purificación mediante HPLC y una interfase de cromatografía gaseosa (Trace GC, Carlo Erba, Milán, Italia) para finalmente analizarlos por el espectrómetro de masa Automass Solo (ThermoFinnigan, Les Ulis, Francia). Se determinaron los niveles de testosterona, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona DHT, derivados reducidos de testosterona y estradiol, expresándose los resultados como ng/gramo de tejido o como ng/ml de plasma. Para este procedimiento se combinaron aleatoriamente muestras de 2 ratones

diferentes para obtener una cantidad suficiente de tejido (al menos de 40 a 50 mg), lo que permite detectar con alta precisión los esteroides diana con una relación señal-ruido adecuada. La metodología exacta se describe en su totalidad en (Liere et al., 2000) y la misma permite conocer los niveles reales de esteroides, tema discutido en un trabajo nuestro en colaboración con este grupo (M. C. Gonzalez Deniselle et al., 2016). Estas determinaciones se realizaron por cromatografía gaseosa seguida de espectrometría de masa, en colaboración con los Drs. Rachida Guennoun y Michael Schumacher (INSERM, Hospital de Bicetre, Paris, Francia).

### **Análisis estadístico**

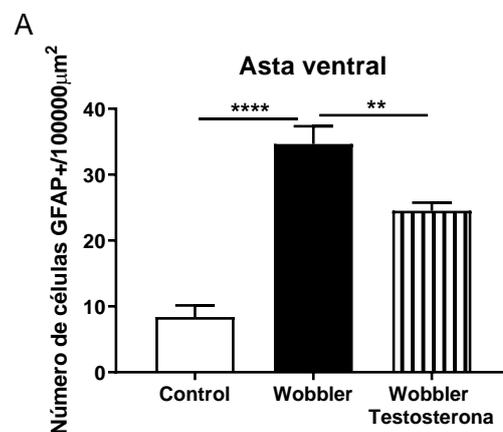
Los datos se expresan como medias  $\pm$  S.E.M (error estándar de la media). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Graph Pad PRISM 8.0 .1, (San Diego, CA, USA). El nivel de significancia se fijó en  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba t de Student, ANOVA unidireccional o bidireccional seguido de la prueba post hoc de Newman-Keuls. Estudios de regresión lineal se utilizaron para relacionar el diámetro de la mielina y axón. El peso corporal se analizó mediante ANOVA bidireccional de medidas repetidas seguido de la prueba post hoc de comparación múltiple de Bonferroni. Se utilizaron ANOVA bidireccional y la prueba post hoc de Bonferroni para analizar la latencia de caída en la prueba de grilla vertical. Para comprar el grado de atrofia de las patas entre Wobbler vs Wobbler + testosterona se utilizó ANOVA bidireccional.

## Resultados

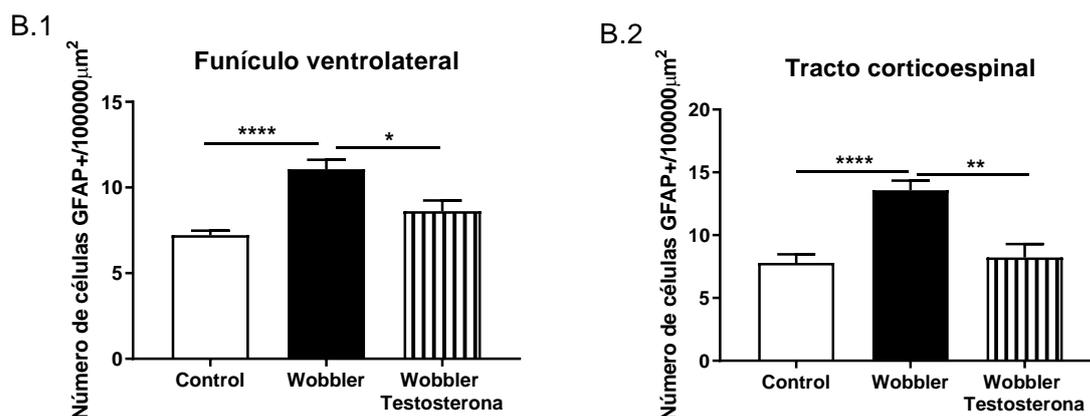
### Efectos de la testosterona sobre células astrogliales y mediadores proinflamatorios

La astrogliosis es un fenómeno patológico reconocido en la enfermedad del Wobbler (Harald Jockusch et al., 2014). Los experimentos realizados mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales con respecto al número de células inmunorreactivas para GFAP por medio de ANOVA de una vía. El análisis post-hoc mostró mayor número e hipertrofia de las células GFAP + en el asta ventral del grupo Wobbler, confirmando la astrogliosis ( $p < 0,0001$ ; Figura 7.A). Este parámetro se redujo con el tratamiento androgénico en ratones Wobbler + testosterona, donde se observó una disminución significativa del número y tamaño de los astrocitos. El tamaño de los astrocitos se analizó a través del estudio del área inmunorreactiva. En el asta ventral (sustancia gris), en el grupo Wobbler + testosterona se observó una disminución del área inmunorreactiva (Datos no mostrados), y del número de células GFAP+ ( $p < 0.001$  vs Wobbler; Figura 7.A). Se obtuvieron resultados similares de inmunorreactividad para GFAP en la sustancia blanca (funículo ventrolateral y tracto corticoespinal; Figura 7. B1,2). La Figura 7.C ilustra la inmunohistoquímica de GFAP en el asta ventral (sustancia gris) y el funículo ventrolateral (sustancia blanca).

### Sustancia gris



### Sustancia blanca



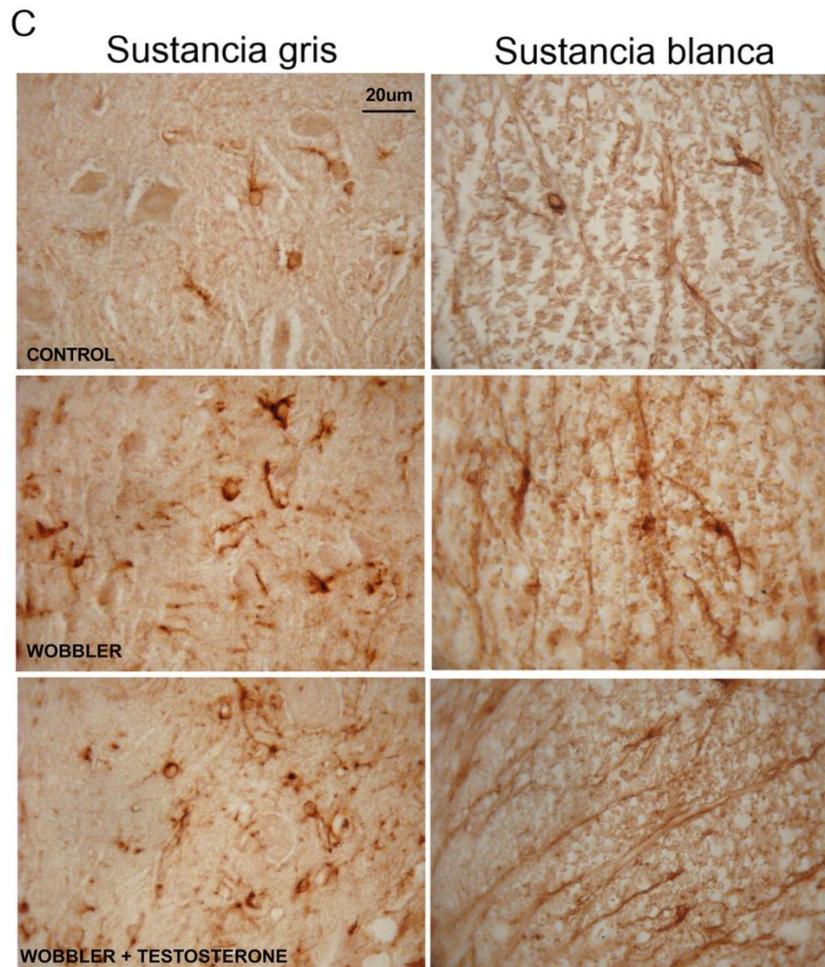


Figura 7: El tratamiento con testosterona de ratones Wobbler disminuyó la astrogliosis GFAP+ en (A) sustancia gris y (B) blanca. Los Wobblers mostraron valores más altos del área celular inmunorreactiva para GFAP y del número de células / 100000  $\mu\text{m}^2$  en sustancia gris y blanca (funículo ventrolateral y tracto corticoespinal, B1 y B2) (\*\* $p < 0,001$ ) frente a ratones control, tanto con respecto a las áreas inmunorreactivas como al número de células). Los Wobblers + testosterona mostraron una disminución en el área inmunorreactiva y número de células GFAP + frente a los Wobblers en las áreas de sustancia gris y blanca (A y B). Área inmunorreactiva de GFAP: \*\*\*  $p < 0,001$  y número de células GFAP + / 100000  $\mu\text{m}^2$ : \*\*  $p < 0,01$  para el asta ventral y el funículo ventrolateral, respectivamente; \*\*\*  $p < 0,001$  para el tracto corticoespinal). Se empleó ANOVA de una vía seguida del test post hoc de Newman-Keuls. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$  animales por grupo. (C) Imágenes representativas de GFAP + astrogliosis en el asta ventral (sustancia gris, panel izquierdo) de un control, Wobbler y Wobbler tratado con testosterona y en el funículo ventrolateral (panel derecho). Barra interior: 20  $\mu\text{m}$ .

En una segunda etapa, se estudió la expresión del ARNm para factores inflamatorios como TLR4, TNF $\alpha$  y antiinflamatorios como TGF $\beta$ 1. El análisis ANOVA mostró diferencias de grupo significativas para la expresión de ARNm de TNF $\alpha$  y TLR4. En Wobblers no tratados, las comparaciones post-hoc demostraron niveles aumentados de TNF $\alpha$  (Figura 8.A;  $p < 0,001$ ), y mRNA de TLR4 (8.B;  $p < 0,05$ ) comparados con los ratones controles. También observamos que el tratamiento con testosterona disminuyó los niveles de TNF $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) y de ARNm de TLR4 ( $p < 0,05$ ) comparativamente con los Wobblers no tratados; alcanzando niveles similares a los observados en los controles (Wobbler +

testosterona vs. control:  $p > 0.05$ ) (Figura 8.B). Por el contrario, se observó un patrón de expresión diferente para el factor antiinflamatorio TGF $\beta$ 1. El análisis ANOVA también mostró diferencias de grupo significativas para la expresión de ARNm de TGF $\beta$ 1 (Figura 8.C;  $p < 0,0001$ ). El ARNm de TGF $\beta$ 1 aumentó ligeramente en Wobblers ( $p < 0,05$  frente al control), un aumento que fue potenciado por el tratamiento con testosterona ( $p < 0,01$  frente a Wobbler; Figura 8.C).

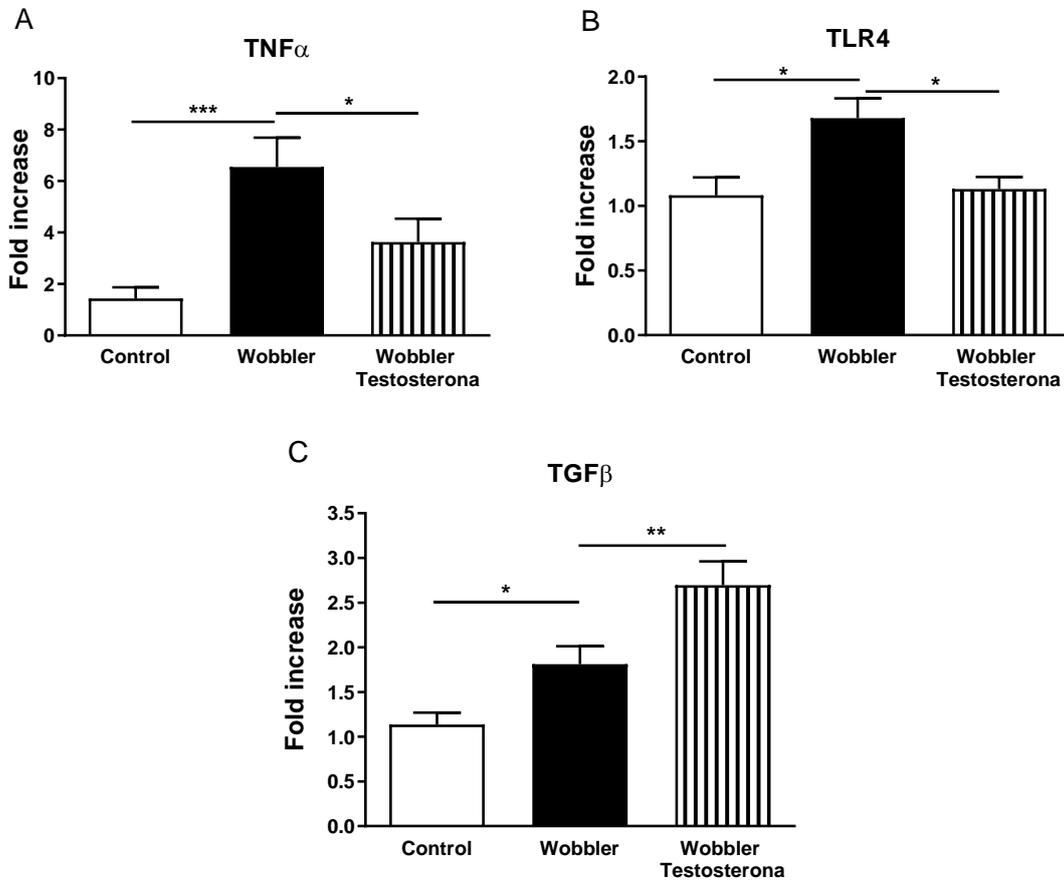


Figura 8. Los ratones Wobbler expresaron mayores niveles de ARNm TNF $\alpha$  (8.A; \*\*\* $p < 0.001$ ), y TLR4 (8.B; \* $p < 0.05$ ) comparado a ratones control. Wobblers tratados mostraron la disminución de estas moléculas proinflamatorias (TNF $\alpha$ : \* $p < 0.05$  y TLR4 ARNm: \* $p < 0.05$  vs. Wobblers). Se encontró un leve aumento de TGF $\beta$ 1 en Wobblers (8.C; \* $p < 0.05$  vs. control), efecto que se vio aumentado con el tratamiento de testosterona (8.C; \*\* $p < 0.01$  vs. Wobbler). ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Newman-Keuls. Datos presentados como media  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$  animales por grupo.

Posteriormente, estudiamos los niveles de la enzima GS, enzima de localización glial que metaboliza el glutamato. El ANOVA de una vía mostró que el grupo Wobbler no tratado presentó una disminución significativa en la expresión de GS en relación a los animales controles ( $p < 0.05$ , Figura 9). Por otra parte, el número de células GS+ fue mayor en el grupo Wobbler que recibió testosterona, alcanzando niveles semejantes a los controles ( $p < 0.001$  vs Wobbler; ns vs control, Figura 9).

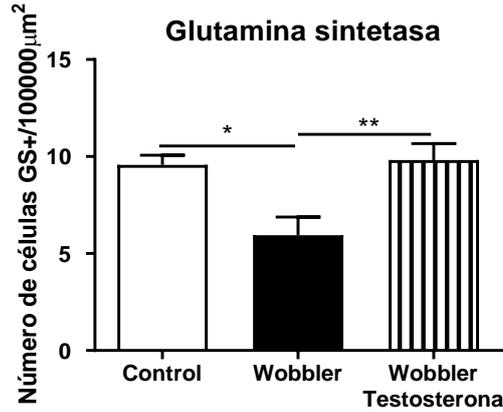


Figura 9. El número de células GS + se redujo en Wobblers no tratados (\* p <0.05 vs control). La testosterona restituyó los valores alcanzando niveles semejantes a los controles (\*\* p <0.001 vs Wobbler)

Se realizaron estudios para comprobar si existía colocalización de GS con GFAP, marcador astrogial. Los mismos mostraron baja colocalización entre estos 2 marcadores en sustancia gris de Wobbler (Figura 10).

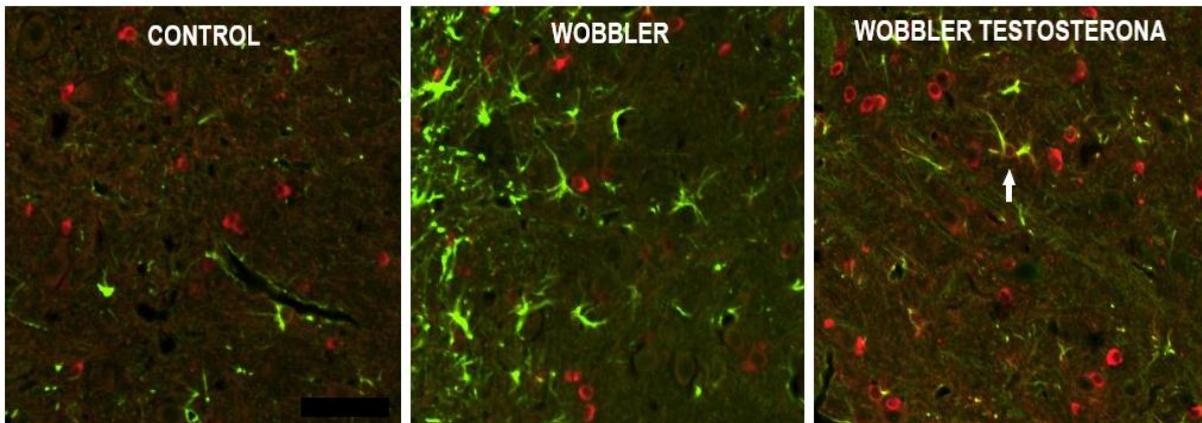


Figura 10. Inmunohistoquímica GS / GFAP, en rojo se muestran las células GS +, en verde células GFAP +. La flecha blanca en Wobbler testosterona indica una célula aislada con doble marcación.

### Efectos del tratamiento con testosterona sobre los oligodendrocitos y las proteínas de la mielina

Existen evidencias en la literatura que la testosterona tiene efectos promielinizantes en el SNC, de acuerdo a lo detallado en la introducción. En una segunda etapa, se cuantificaron las células CNPasa+, marcador de oligodendrocitos. Este marcador mostró resultados diferentes. No mostró diferencia significativa en el número de células / área entre los Wobbler no tratados y controles (Figura 11. A), mientras que en el grupo Wobbler + testosterona se observó una distribución distinta de dicha proteína con aumento de inmunoreactividad en las prolongaciones (ver Figura 11. B).

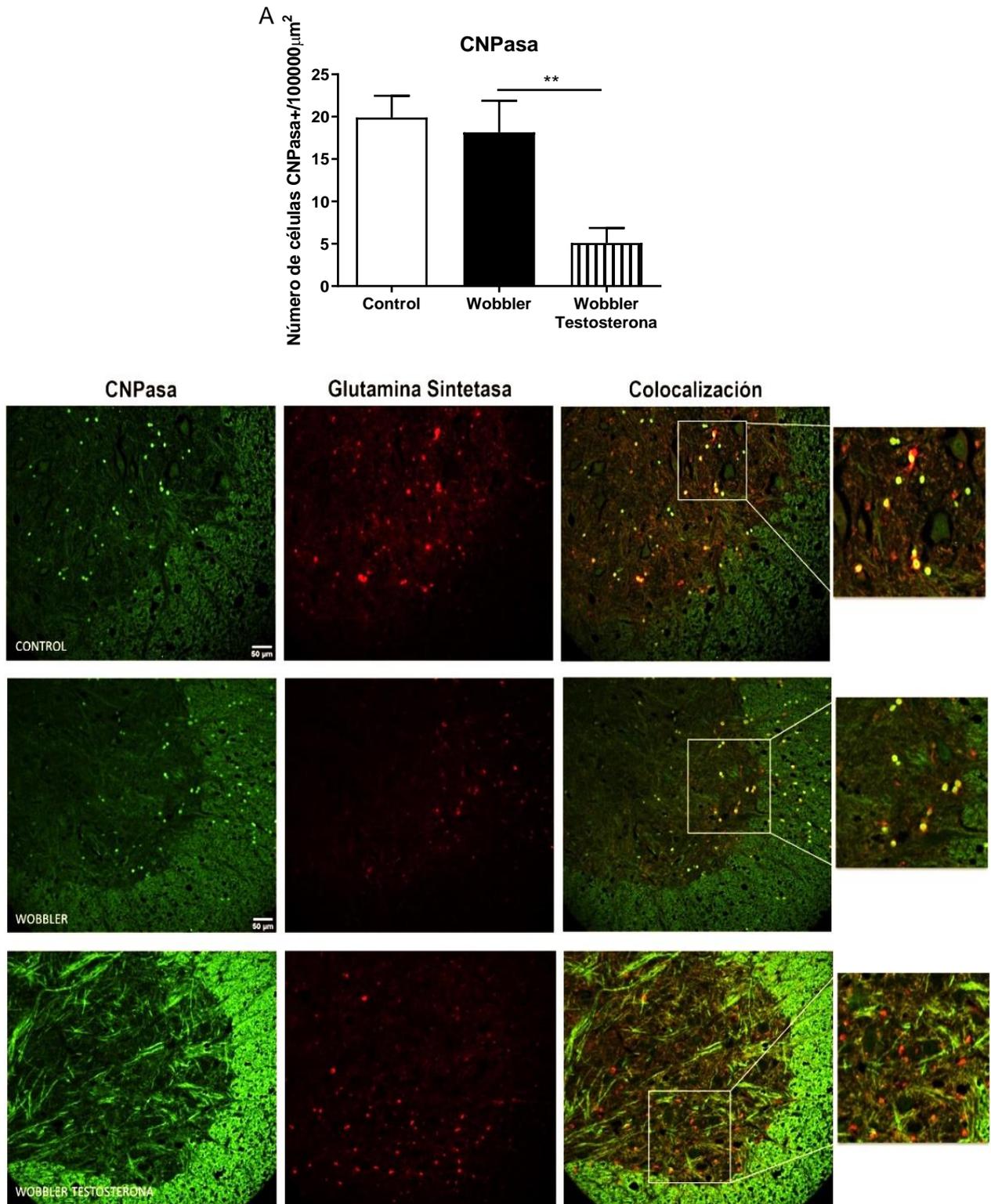


Figura 11. A: La cuantificación de células CNPasa+ se realizó en el asta ventral de cada grupo, se encontraron diferencias en Wobbler vs Wobbler testosterona (\*\* p <0.001). B: Inmunofluorescencia de CNPasa, GS y colocalización de ambas marcas en médula espinal cervical. Barra interna: 50μm.

En el estudio de colocalización GS/CNPasa se buscó determinar qué porcentaje de oligodendrocitos presentaban la enzima GS. Los resultados obtenidos mostraron que en los grupos Wobbler y control aproximadamente un 80% de la enzima GS se encontraba expresada en células

CNPasa+ (Figura 12). La colocalización disminuyó de forma significativa en el grupo de Wobblers tratados con testosterona ( $p < 0.0001$  vs Wobbler).

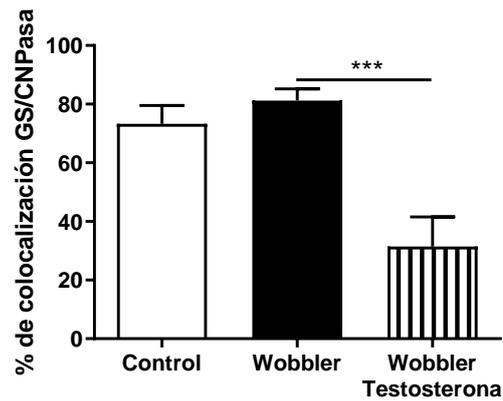
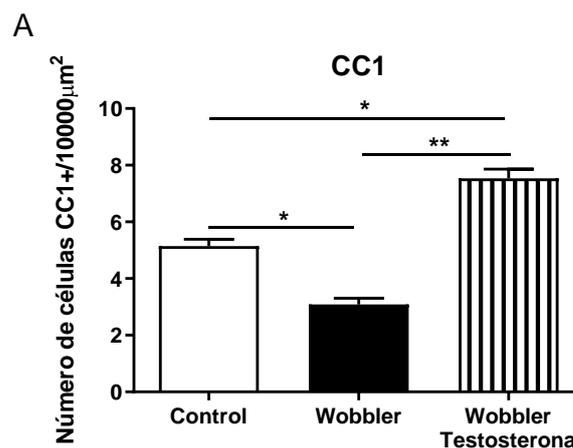


Figura 12. Colocalización de GS/CNPasa, se cuantificaron las células que presentaban superposición de marcas (ver figura 11. B). El ANOVA de una vía mostro que Wobbler vs Wobbler testosterona \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Estudiamos, también, el efecto de testosterona sobre la inmunoreactividad de células oligodendrogiales CC1+ en el funículo ventrolateral. La prueba de ANOVA de una vía demostró un aumento significativo en el número de células CC1+ por unidad de área en el grupo Wobbler + testosterona, respecto de los Wobbler no tratados ( $p < 0.01$  vs Wobbler + testosterona, Figura 13. A) y de los controles ( $p < 0.05$  vs. Wobbler + testosterona, Figura 13. A). El grupo Wobbler que no recibió testosterona presentó la mitad de células CC1+ con relación al grupo control ( $p < 0.05$ ).



B

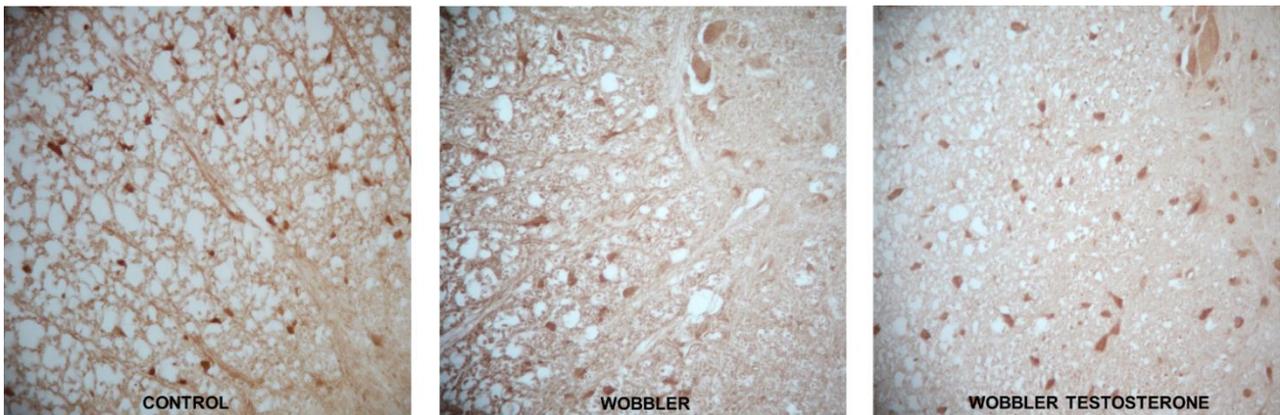


Figura 13. A: Cuantificación de células CC1 + en FVL, los resultados corresponden al número de células en un área de  $1000\mu\text{m}^2$ . La Figura 13. B muestra fotografías de la histoquímica de CC1 en los tres grupos (magnificación 200x).

En lo que respecta a la mielina, ésta se estudió por tinción de Luxol Fast Blue, que tiñe mielina total, y además por análisis de proteínas específicas de mielina central como MBP. El estudio a nivel proteico de MBP en el funículo ventrolateral mediante inmunohistoquímica presentó diferencias significativas entre los tres grupos. Los resultados del test de ANOVA mostraron un aumento de 4 veces del porcentaje de área inmunorreactiva en el grupo Wobbler + testosterona en relación a los controles ( $p < 0.0001$ ). Interesantemente, los Wobbler no tratados presentaron un aumento al doble del porcentaje de inmunoreactividad para MBP en relación al grupo control ( $p < 0.05$ , Figura 14). Mediante qPCR se estudió también la expresión del ARNm para MBP. El análisis de ANOVA no presentó diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ).

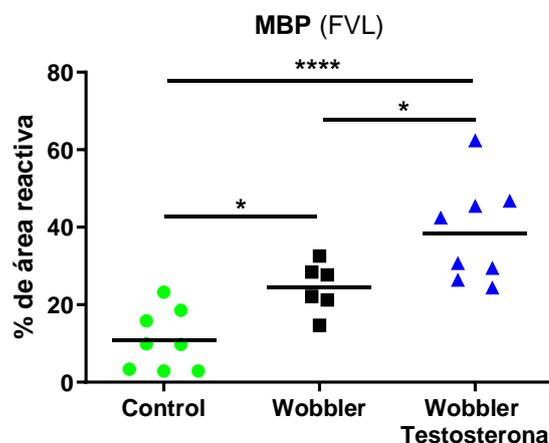


Figura 14. Inmunorreactividad de MBP en el funículo ventrolateral, mayor área inmunorreactiva en el grupo Wobbler + testosterona ( $p < 0.0001$ ) y Wobbler ( $p < 0.05$ ) en relación a los controles.

En el estudio de la mielina mediante la tinción de LFB se cuantificó el % de área reactiva por encima de un umbral. La mielina del FVL en el grupo control presentó valores elevados de reactividad y una distribución uniforme de la tinción (Figura 15). En el grupo Wobbler hubo una marcada disminución en el área reactiva ( $p < 0.001$  vs. control), que se vio revertida por el tratamiento con testosterona (Wobbler + testosterona vs. Wobbler;  $p < 0.01$ ).

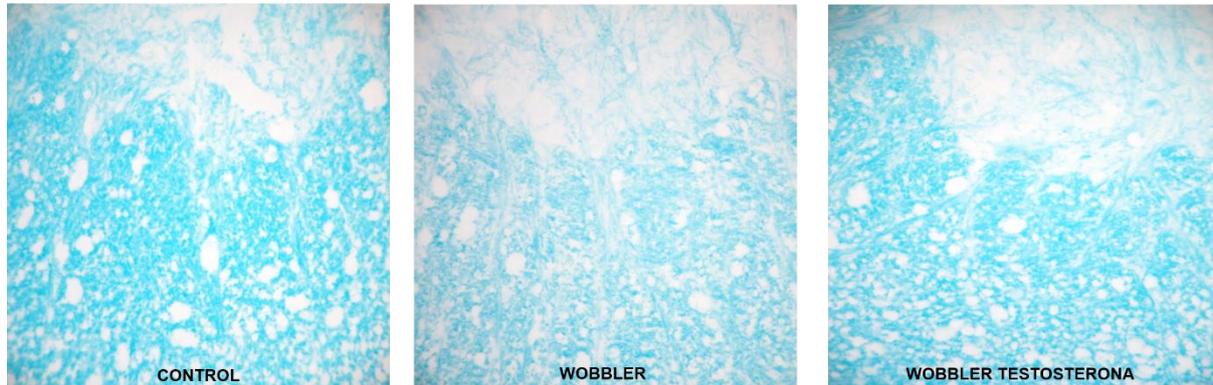


Figura 15. Tinción con LFB en funículo ventrolateral, este compuesto se une a las bases que se encuentran en las lipoproteínas de la vaina de mielina. Magnificación 200x.

### **Efecto del tratamiento con testosterona sobre la relación mielina/axón en sustancia blanca de animales Wobbler**

Este experimento permitió estudiar si el tratamiento con testosterona ejerce efectos sobre las características de la mielina observada al microscopio óptico en cortes semifinos de 1 $\mu$ m. Además, analizamos si la hormona modifica la relación entre el grosor de la mielina con el diámetro axonal. Específicamente, a partir de los cortes semifinos medimos el diámetro de los axones y sus respectivas vainas de mielina para así analizar tanto el estado de las mismas como también calcular la proporción  $g$ . El estudio de la regresión lineal entre ambos parámetros permitió demostrar un efecto significativo del tratamiento androgénico en el funículo ventrolateral (sustancia blanca) de la medula espinal cervical (Figura 16.A). En el grupo Wobbler + testosterona, se observó un marcado incremento en el grosor de las vainas de mielina proporcional al diámetro axonal (Wobbler + testosterona:  $Y=0.2313 \cdot X+0.1756$ ;  $p < 0.0005$ , Figura 16.A), resultado similar al observado en ratones controles (controles:  $Y=0.1094 \cdot X+0.3906$ ;  $p < 0.001$ , Figura 16.A). El análisis de este parámetro fue muy diferente en el grupo Wobbler sin tratamiento donde la desviación de la recta no fue significativa, es decir el grosor de las vainas de mielina no fue proporcional al diámetro axonal, es decir que el grosor de las vainas mielina resultaba ser independiente del diámetro axonal (Wobbler:  $Y=0.001142 \cdot X+0.9543$ ;  $p > 0.05$ ). En el gráfico A se muestra como el grosor de las vainas de mielina se mantienen en valores cercanos a 1 $\mu$ m, tanto en axones de mayor o menor diámetro. Los resultados de ANOVA de una vía de la proporción  $g$  mostraron un aumento significativo de este parámetro en Wobblers no tratados vs. a los Wobbler + testosterona ( $p < 0.005$ , Figura 16.B), indicando que los Wobblers presentaron una mayor cantidad de axones con una vaina de mielina más delgada que la que se observa en controles. Recordemos que el factor  $g$  mide la relación  $\text{área axonal} / (\text{área axonal} + \text{mielina})$ . Como se observa en la Figura 16.B,

el grupo control mostró un factor  $g = 0.712208 \pm 0.0037$  vs.  $0.779387 \pm 0.0044$  del grupo Wobbler ( $p < 0.0001$ ). Por otra parte, en Wobbler + testosterona el factor  $g = 0.755158 \pm 0.0045$ , resultó significativamente diferente ( $p < 0.01$ ) vs. Wobbler libres de tratamiento.

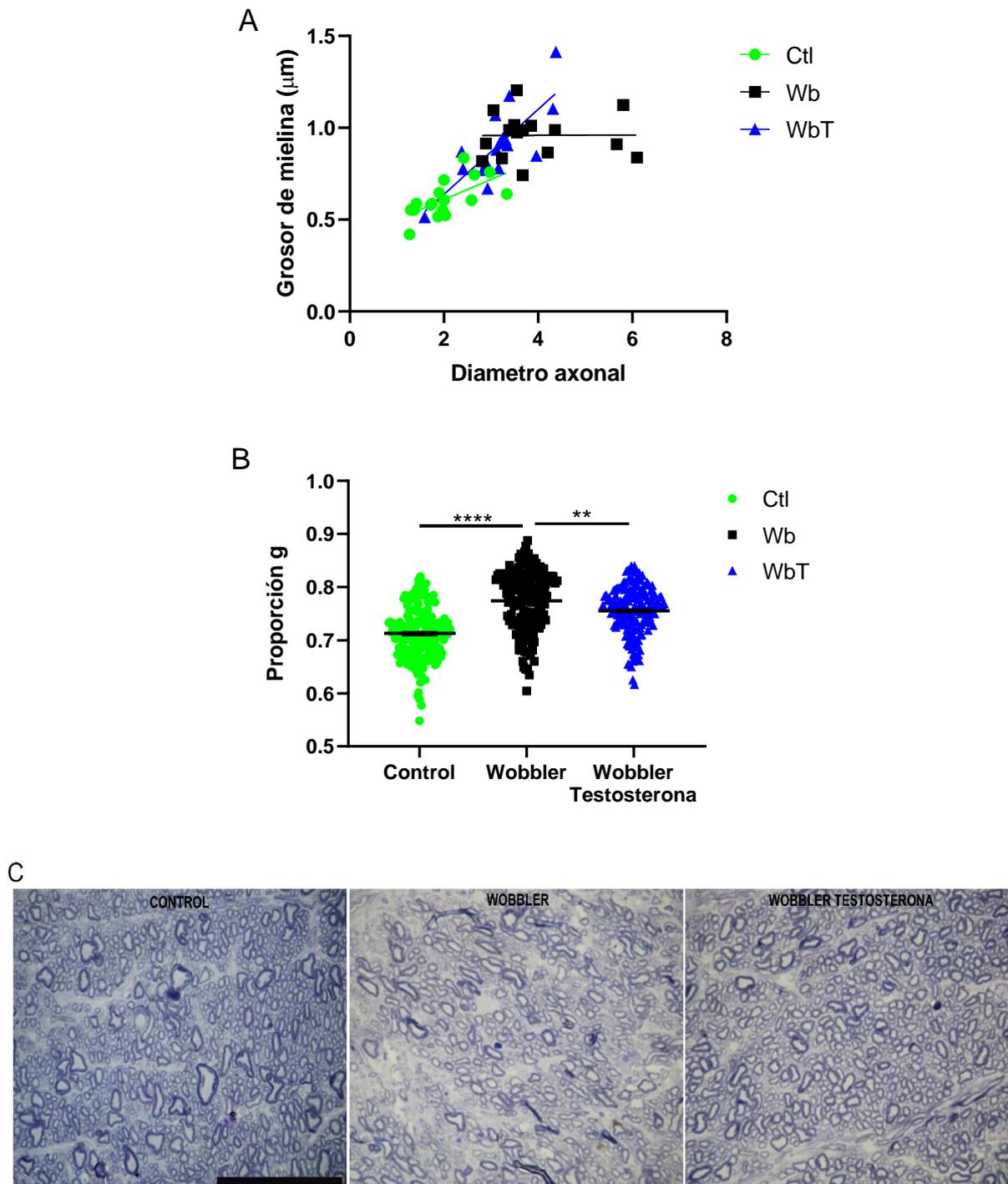
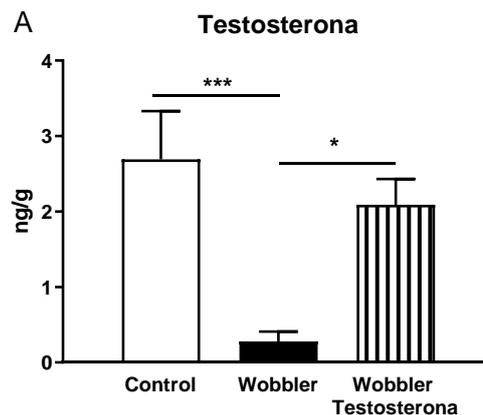


Figura 16. (A) Grosor de la mielina contra diámetro axonal en controles (círculos verdes), Wobbler (cuadrados negros) y Wobbler + testosterona (triángulos azules) en FVL. Las pendientes se compararon mediante la prueba F de suma extra de cuadrados, se informó significancia cuando  $p < 0.05$ . (B) Dispersión de los valores de relación  $g$ , correspondiente a la resta del diámetro de la capa de mielina compacta más interna del diámetro de la capa de mielina compacta más externa. (C) Fotografías del FVL en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Barra interna:  $50\mu\text{m}$ .

## Niveles de testosterona y sus metabolitos en médula espinal cervical

En el SNC, la testosterona puede metabolizarse a sus derivados reducidos por medio de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa o en estradiol por medio de la enzima aromatasa. Una parte de la testosterona también se puede convertir en androstenediona mediante 17 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>. Los datos obtenidos de médula espinal cervical con la técnica de GC/MS fueron analizados por ANOVA de 2 vías (genotipo x tratamiento), el cual reveló: (1) un efecto significativo del genotipo en los niveles de testosterona ( $F_{(1, 19)} = 6.755$ ;  $p < 0.05$ ) y androstenediona ( $F_{(1,68)} = 5.477$ ;  $p < 0.05$ ); (2) un efecto significativo del tratamiento sobre los niveles de 5 $\alpha$ -DHT ( $F_{(1, 20)} = 6.724$ ;  $p < 0.05$ ), 3 $\alpha$ -androstaneol ( $F_{(1, 20)} = 6.637$ ;  $p < 0.05$ ), y 3 $\beta$ -androstaneol ( $F_{(1, 21)} = 24.58$ ;  $p < 0.0001$ ) en médula espinal cervical; e (3) interacción (genotipo x tratamiento) en los niveles de testosterona ( $F_{(1, 19)} = 15.86$ ;  $p < 0.001$ ), 5 $\alpha$ -DHT ( $F_{(1, 20)} = 14.76$ ;  $p < 0.01$ ), 3 $\beta$ androstaneol ( $F_{(1, 21)} = 24.58$ ;  $p < 0.0001$ ), y androstenediona ( $F_{(1, 21)} = 6.688$ ;  $p < 0.05$ ). La prueba post-hoc de Bonferroni indicó que los Wobbler mostraron niveles más bajos de testosterona ( $p < 0,001$ ), 5 $\alpha$ -DHT ( $p < 0,01$ ), 3 $\beta$ -androstaneol ( $p < 0,05$ ) y androstenediona ( $p < 0,01$ ) en comparación al grupo control (Figura 17) la concentración de 3 $\alpha$ -androstaneol tendió a ser menor en Wobblers pero sin alcanzar significancia estadística ( $p > 0.05$ ).

Los Wobbler + testosterona mostraron niveles elevados de testosterona, 5 $\alpha$ -DHT y 3 $\beta$ -androstaneol (Figura 17. A  $p < 0.05$ , B  $p < 0.01$ , E  $p < 0.001$  vs. Wobbler no tratados). El 3 $\alpha$ -androstaneol se mostró levemente elevado, pero sin presentar significancia estadística con relación a los Wobblers libres de tratamiento (Figura 17.D,  $p > 0.05$ ). En la médula espinal cervical, los niveles de estradiol, un metabolito de la testosterona debido a la aromatización del anillo A por la enzima aromatasa, fueron indetectables con valores inferiores a 0,001 ng/g (límite inferior de detección) en todos los grupos experimentales.



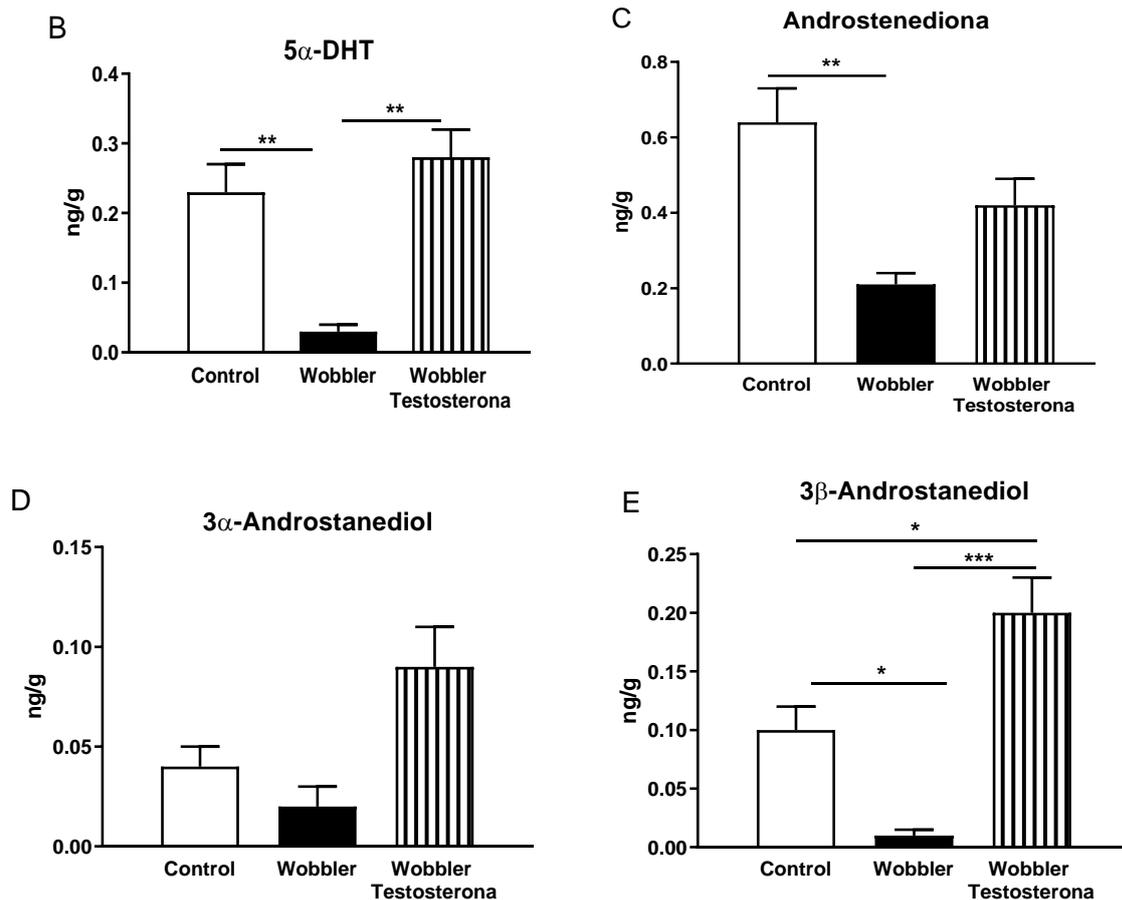


Figura 17. Concentración de testosterona, 5α-DHT, androstenediona, 3α-androstanediol y β-androstanediol (ng/g) en la medula espinal cervical de control, Wobbler y Wobbler + testosterona. Análisis estadístico por ANOVA de dos vías seguido de prueba post-hoc de Bonferroni. Se informo significancia cuando  $p < 0.05$ .

### Efectos del tratamiento con testosterona sobre parámetros clínicos, trofismo muscular y peso corporal

Al cabo de los dos meses de tratamiento, se procesaron los puntajes obtenidos en las evaluaciones clínicas semanales a través de comparar cada valor con el estado clínico inicial de cada ratón por separado. Los datos resultantes de dicha relación se analizaron estadísticamente. El ANOVA de 2 vías mostró un retardo significativo de la progresión de la atrofia de las extremidades anteriores en los ratones Wobbler que recibieron testosterona, en comparación a los Wobbler no tratados ( $p < 0,05$ , Figura 18.A). Con respecto al rendimiento en la prueba de antigraedad (grilla vertical) no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 18. B).

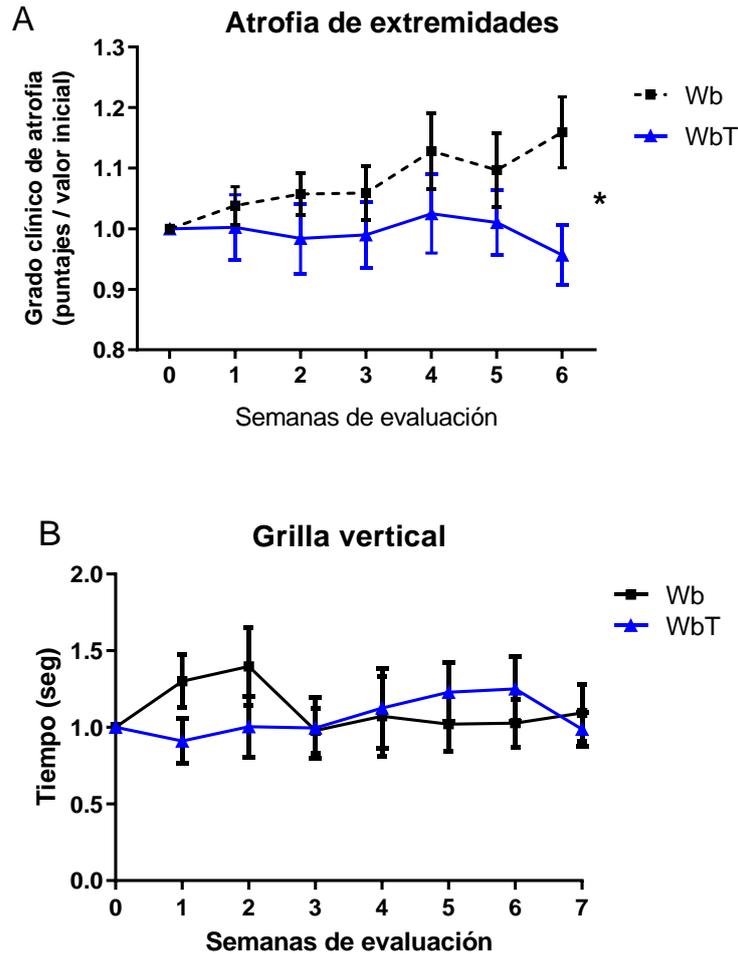


Figura 18. (A) Progreso del puntaje clínico de la atrofia en extremidades anteriores expresado como cambio fraccional. La progresión fue ralentizada por el tratamiento con testosterona (\* $p < 0.05$  vs. Wobblers no tratados). (B) Cambio fraccional del tiempo soportado en antigravedad en ambos grupos a lo largo del tratamiento.

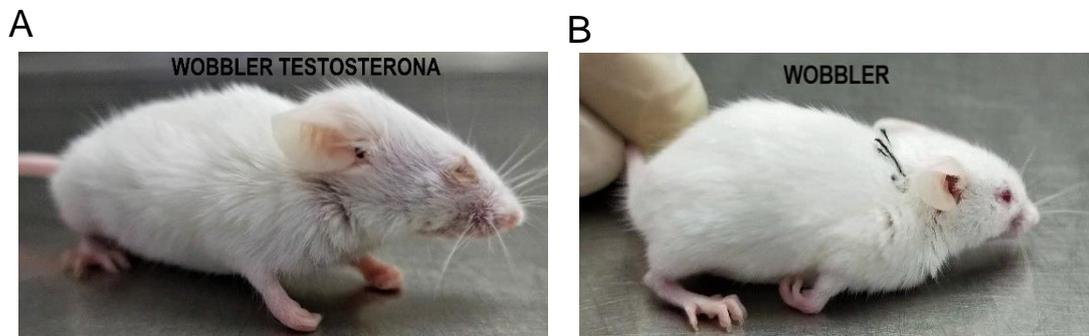


Figura 19: Fotos de ejemplares Wobbler con distintos grados de atrofia de miembros anteriores. A: Wobbler + testosterona con grado 2.5, B: Wobbler no tratado de grado 4.

A fin de observar si el tratamiento con testosterona produjo efectos sobre el trofismo muscular, se analizaron los músculos bíceps. Los bíceps son músculos localizados en las extremidades anteriores, región altamente afectada en el ratón Wobbler. Estos tejidos se pesaron directamente luego de su disección anatómica. Dado que existe una diferencia en el peso corporal en los animales de los

distintos grupos experimentales, se realizó una relación entre el peso de los bíceps y el correspondiente peso corporal. Demostramos una marcada atrofia de los músculos bíceps de Wobbler con relación a controles ( $p < 0.01$  vs control, Figura 20. A), mientras que el tratamiento con testosterona produjo un aumento significativo en relación a los Wobbler no tratados ( $p < 0,001$  vs Wobbler, Figura 20. A). Así, se observó que los bíceps de Wobbler + testosterona presentaron valores similares a los controles (NS vs control, Figura 20. A). El análisis histológico de estos músculos se realizó a través de la determinación del eje mayor de las fibras musculares, el cual mostró resultados similares a lo que demostramos en relación al peso. Los animales Wobbler no tratados presentaron fibras musculares más pequeñas que los Wobbler + testosterona ( $p < 0.05$ , Figura 20. B) y que los controles ( $p < 0.001$ , Figura 20. B).

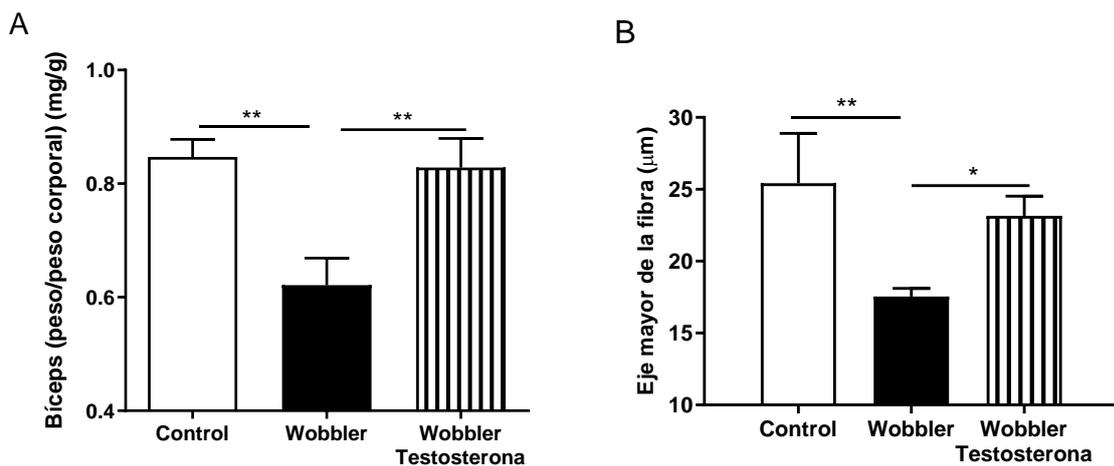


Figura 20: A: Peso del músculo bíceps en controles, Wobbler y Wobbler + testosterona. B: Eje mayor de fibras musculares ( $\mu\text{m}$ ) en controles, Wobbler y Wobbler + testosterona

El peso corporal cambió favorablemente en los controles y Wobblers durante los 60 días de seguimiento ( $p < 0,001$ , Figura 21), análisis estadístico realizado por medio de ANOVA de medidas repetitivas. El peso corporal de Wobbler no se modificó por la testosterona, y permaneció más bajo que el peso de los Wobbler sin tratamiento (NS vs Wobbler, Figura 21).

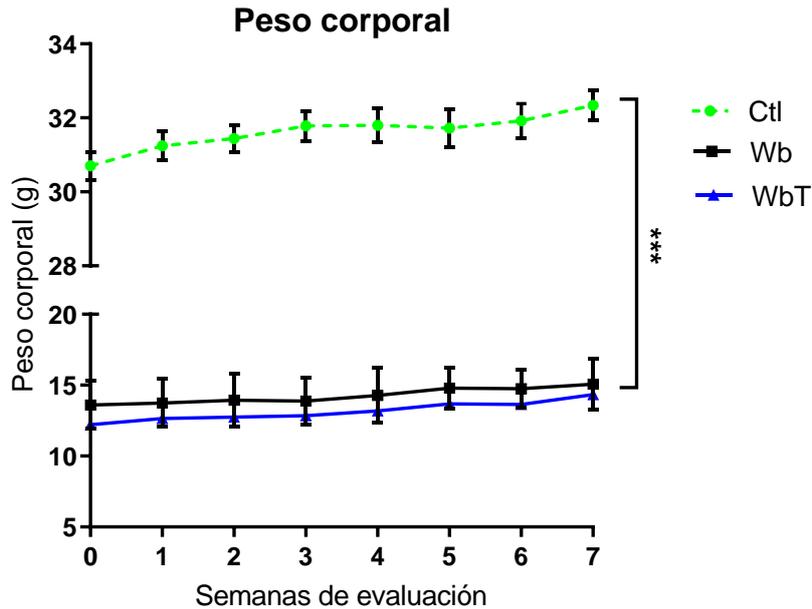


Figura 21. Peso corporal de controles, Wobblers y Wobblers tratados (Wobbler y Wobbler testosterona vs. Control \*\*\*p <0.001, ANOVA de medidas repetitivas). Ctl: control, Wb: Wobbler y Wb T: Wobbler + testosterona.

### Efectos de la testosterona sobre las glándulas endócrinas

Finalmente, analizamos el efecto esteroide sobre órganos blanco como pituitaria, suprarrenales, testículos y vesículas seminales. Se observó un efecto significativo del tratamiento androgénico en este modelo experimental (Figura 22). La prueba post-hoc de Bonferroni reveló un valor significativamente mayor del peso de la glándula pituitaria / peso corporal en Wobblers vs. controles ( $p < 0.05$ , 22.A), que no fue modificada por el tratamiento con testosterona (Wobbler vs. Wobbler + testosterona  $p > 0.05$ , 22.A.). Con respecto al peso de los testículos y las suprarrenales, observamos una mayor relación peso / peso corporal en Wobbler en comparación a controles ( $p < 0.001$  vs. Wobbler, 22.B, C). Asimismo, el tratamiento con testosterona disminuyó este parámetro mostrando valores más cercanos a controles (Glándulas suprarrenales:  $p < 0.001$  vs control, testículos: NS vs. control) y menores a Wobbler ( $p < 0.01$  vs Wobbler; 22. B, C). El análisis post-hoc también indicó un efecto androgénico sobre las vesículas seminales. La hipertrofia de vesículas seminales fue significativa después del tratamiento con testosterona en Wobblers en comparación a ratones Wobbler sin tratamiento ( $p < 0.001$ , 22. D).

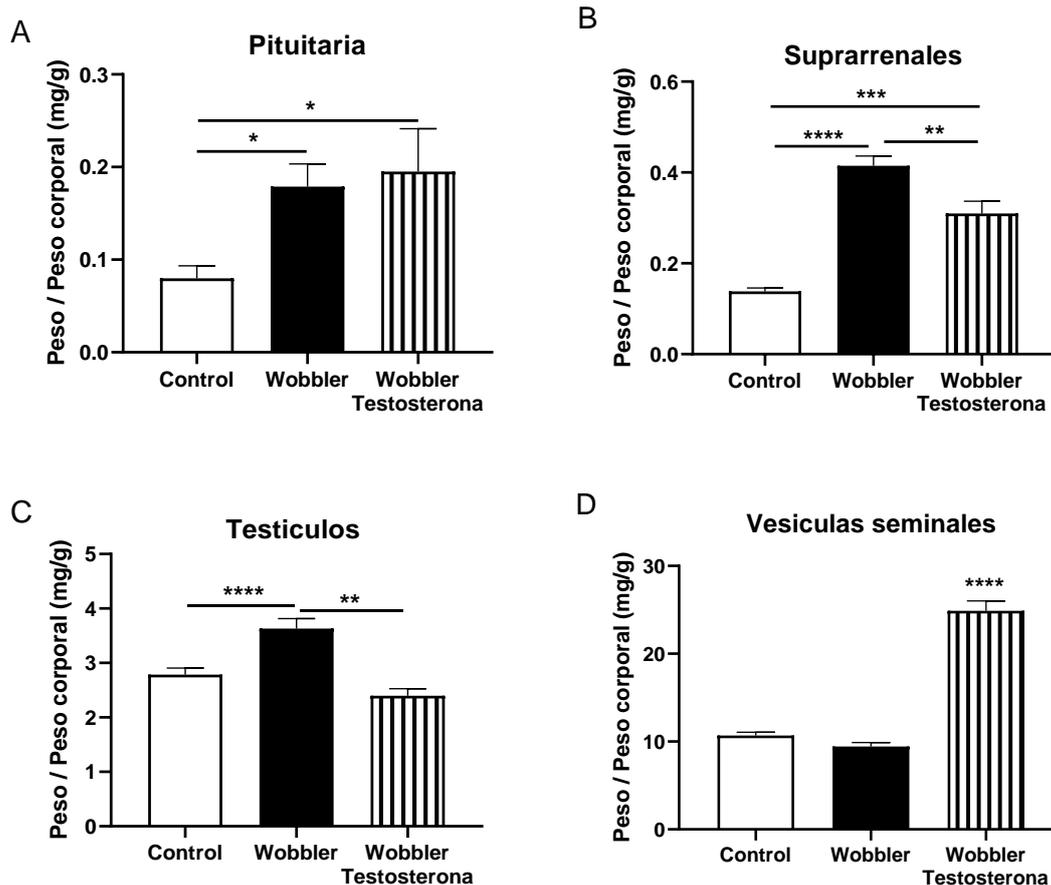


Figura 22. (A) La relación peso de glándula pituitaria / peso corporal mostro valores mayores en Wobbler y Wobbler testosterona con respecto al control ( $p < 0.05$ ). (B, C) Las glándulas suprarrenales y los testículos mostraron un aumento de peso en animales Wobbler ( $p < 0.001$  vs controles) que disminuyo con la testosterona ( $p < 0.01$  vs Wobbler tratados). El peso de los testículos en animales tratados y control fue similar (NS). (D) Las vesículas seminales presentaron hipertrofia en Wobblers que recibieron testosterona ( $p < 0.001$  vs Wobbler y control). Peso de tejidos estudiados mediante ANOVA de dos vías y prueba post hoc de Bonferroni.

### Efectos del tratamiento con testosterona sobre los receptores de esteroides y las enzimas del metabolismo de los andrógenos

Los efectos de la testosterona están mediados en gran medida por el receptor de andrógenos (AR); aunque la reducción a  $5\alpha$ -DHT, la aromatización en estrógenos o la unión al receptor Sigma-1 amplían las posibilidades funcionales. En este contexto, se determinó los niveles de ARNm para AR, receptor de estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ), y las enzimas aromatasa y  $5\alpha$ -reductasa para dilucidar qué moléculas pueden participar en los efectos de la testosterona en los ratones Wobbler. Los resultados de qPCR demostraron cambios en la expresión de ARNm de varias de estas moléculas. Por lo tanto, el análisis por ANOVA mostró diferencias de grupo significativas para AR (Figura 23. A.  $F(2, 36) = 5.721$ ,  $p < 0.05$ ),  $ER\alpha$  (B.  $F = 5.344$ ,  $p < 0.05$ ), aromatasa (C.  $F = 8.510$ ,  $p < 0.05$ ) pero no para la  $5\alpha$ -reductasa. Las comparaciones post hoc mostraron que el ARNm de AR era similar en ratones Wobbler y en

controles ( $p > 0,05$ ) y disminuyó después del tratamiento con testosterona (Figura 23 A;  $p < 0,01$ , Wobbler + testosterona frente a Wobbler). Los ARNm de ER $\alpha$  y aromatasa aumentaron en Wobblers comparándolos con los controles (Figura 23. B y C;  $p < 0,05$ ) y ambos disminuyeron después del tratamiento con testosterona (ER $\alpha$ :  $p < 0,05$ , y aromatasa:  $p < 0,01$ ; Wobbler + testosterona frente a Wobblers).

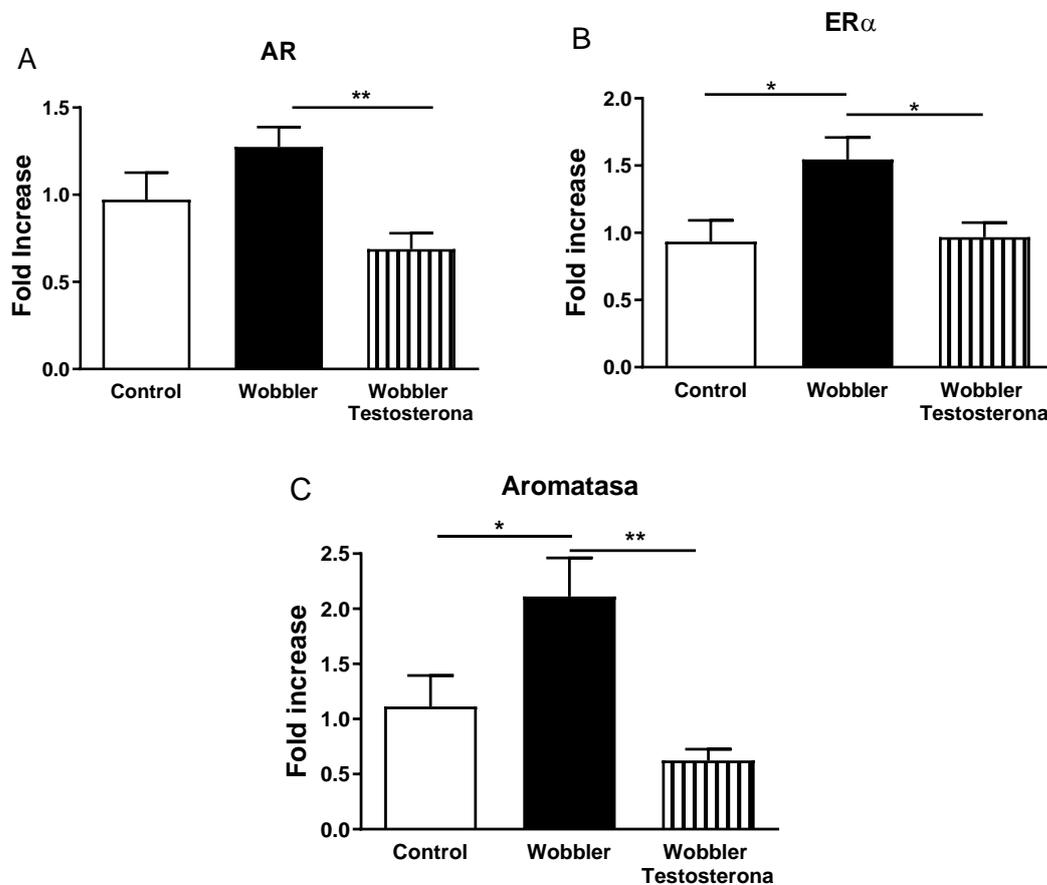


Figura 23. El tratamiento con testosterona de ratones Wobbler redujo el receptor de andrógenos (AR), el receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) y los ARNm de aromatasa en la médula espinal cervical. (A) Se mostraron valores similares de AR mRNA en Wobblers y controles (NS), mientras que la testosterona disminuyó AR en Wobblers (\*\*  $p < 0,01$  Wobbler + testosterona vs. Wobbler). (B) ER $\alpha$  fue mayor en Wobblers frente a controles (\*  $p < 0,05$ ) y disminuyó después del tratamiento con testosterona (\*  $p < 0,05$  frente a Wobblers). (C) El ARNm de aromatasa aumentó en Wobblers (\*  $p < 0,05$  frente a controles) y se redujo después del tratamiento con testosterona (\*\*  $p < 0,01$  frente a Wobblers). ANOVA de una vía seguido de prueba post hoc de Newman-Keuls. Datos expresados como media  $\pm$  SEM,  $n = 12-14$  animales por grupo

## Discusión

Esta tesina de Licenciatura se enfocó sobre los efectos protectores y mielinizantes de la testosterona sobre un modelo murino de ELA, el ratón mutante Wobbler. Como un objetivo de esta tesina era demostrar acciones terapéuticas in vivo, discutiremos primeramente los hallazgos preclínicos. Así, demostramos que la testosterona enlenteció la progresión de la atrofia en las extremidades anteriores. Además, este tratamiento produjo un aumento de la masa muscular de los bíceps brachii de Wobbler, aunque no se demostró un incremento significativo de la fuerza muscular. La fuerza muscular se evaluó a través de la determinación del tiempo que los animales permanecen en situación antigravitatoria. En este sentido, los Wobbler en estadio sintomático mostraron una marcada atrofia muscular asociada a una importante disminución de la fuerza muscular, ya que estos animales no permanecen fijos a la grilla vertical en relación a los controles, los cuales permanecen fijos a la grilla así como también caminan contra gravedad. El incremento de la masa muscular por testosterona podría asociarse a un aumento en la fuerza muscular; sin embargo, este efecto no fue aparente en este trabajo, por lo que nuevos experimentos serán necesarios para corroborar este efecto empleando diferentes tests de actividad motora. Además, observamos que el peso corporal de Wobbler, se mantuvo en valores muy inferiores a los controles, mientras que no fue modulado por tratamiento con testosterona. Asimismo, el peso pituitario, un tejido sensible a estradiol, no fue modificado por testosterona en Wobbler (Piroli et al., 2002). Por otra parte, se observó un menor peso testicular / peso corporal y de glándulas suprarrenales en los Wobbler + testosterona. La acción esteroide sobre las glándulas suprarrenales podría asociarse a una acción inhibitoria de la testosterona o sus metabolitos sobre el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA) (Heck & Handa, 2019). La reducción del peso testicular después del tratamiento con testosterona podría deberse a la inhibición de las gonadotropinas hipofisarias. Con respecto a las vesículas seminales se demostró un incremento en su tamaño por tratamiento androgénico. Este último efecto podría estar mediado por la unión de testosterona o de su derivado reducido  $5\alpha$ -DHT al receptor AR. Asimismo, se sabe que las vesículas seminales tienen alta concentración de la enzima 5 alfa-reductasa (Clarke et al., 2019). Es importante señalar que estos resultados se obtuvieron con dosis de testosterona exógena que producían concentraciones de testosterona en la médula espinal dentro del rango fisiológico y no con dosis farmacológicas ya que la concentración de testosterona fue similar entre los animales controles y los Wobblers tratados con testosterona. En este sentido, cabe destacar que los Wobbler machos presentan bajos niveles de testosterona en SNC, en testículo y en circulación (Gonzalez Deniselle et al 2016), por lo que la normalización observada gracias al tratamiento por 2 meses con testosterona exógena no se debía a dosis muy elevadas.

A nivel neuroquímico y celular, la testosterona reguló diversos tipos celulares de la médula espinal cervical, región en la que ocurre primariamente la degeneración de motoneuronas en este modelo. En este sentido, observamos disminución de la reactividad glial, de la expresión de factores proinflamatorios e incremento de la inmunorreactividad para glutamina sintetasa. Asimismo, en trabajos previos demostramos también que redujo la hiperactividad microglial. El tratamiento con testosterona aumentó el número de células oligodendrogiales, incrementó la reactividad para LFB, la inmunorreactividad de proteínas de mielina como MBP y CNPasa, así como también mejoró la relación

entre el diámetro del axón y grosor de la mielina. Los efectos de la testosterona sobre los oligodendrocitos de Wobbler aún no habían sido explorados. Específicamente, en este trabajo demostramos la baja densidad de células CC1 positivas en el FVL de la sustancia blanca de ratones Wobbler machos, que aumentó por tratamiento androgénico. En la ELA, así como en el modelo transgénico SOD1 y en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, se ha demostrado la presencia de alteraciones en la función de los oligodendrocitos que resultaron en la hipomelinización (Nonneman et al., 2014; Yingjun LIU, 2013).

Posteriormente, estudiamos los efectos de testosterona sobre otros parámetros de mielina a fin de estudiar si el efecto modulador positivo sobre los oligodendrocitos maduros CC1 + se asociaba a la modulación de proteínas de mielina y características estructurales mielina/axón. Así, los Wobbler que recibieron el tratamiento con testosterona mostraron mayor reactividad en la tinción de la mielina con LFB y un aumento significativo de la inmunoreactividad para MBP. A nivel estructural se observó que los axones localizados en sustancia blanca correspondientes a los Wobblers + testosterona presentaron vainas de mielina de mayor grosor y una proporción g más cercana a valores control, mientras que los Wobbler libres de tratamiento mostraron un grosor de la mielina independiente del diámetro axonal. En el SNC, las vainas de mielina protegen los axones y permiten la rápida propagación de los impulsos eléctricos. Los oligodendrocitos, además de su función formadora de mielina, son células que mantienen la integridad de las neuronas porque tienen función trófica a través de la liberación de factores como el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), y proveen al axón metabolitos como lactato gracias a la expresión del transportador de monocarboxilatos MCT1. En este sentido, Lee y col demostraron que MCT1 está disminuido en oligodendrocitos obtenidos de tejido nervioso derivado de pacientes con ELA y en modelos animales de ELA (Y. Lee et al., 2012). Por otra parte, demostramos que la inmunoreactividad para CNPasa fue similar en las médulas espinales de Wobbler y controles, mientras que el tratamiento con testosterona cambió el patrón de la inmunoreactividad, desde el cuerpo celular a las prolongaciones. La función de esta enzima es esencial para la actividad motora. Así, Lappe-Siefke y col. demostraron que la mutación de la enzima CNPasa 1 en oligodendrocitos en animales de experimentación produce déficit en rendimiento motor por degeneración axonal secundaria sin alteraciones estructurales de la vaina de mielina (Lappe-Siefke et al., 2003).

En relación al proceso de remielinización se sabe que depende de la proliferación de progenitores de oligodendrocitos asociada a una posterior migración de estas células hacia las regiones de interés, donde se diferencian en oligodendrocitos mielinizantes maduros (S. P. J. Fancy et al., 2011). En este sentido, Bielecki et al. (2016) han demostrado que estos progenitores son estimulados por acción de la testosterona a través de su receptor AR en el sistema nervioso periférico. Por lo tanto, la administración de testosterona a Wobbler podría favorecer el proceso de mielinización y mejorar las funciones de los oligodendrocitos, parámetros que deben ser estudiados en mayor profundidad a futuro (Meyer et al., 2012; K.-A. Nave & Trapp, 2008; Saab et al., 2013).

Se observó también muy baja inmunoreactividad para GS en células gliales. La GS es una enzima que sintetiza glutamina a partir del glutamato y, de esta manera, reduce las concentraciones extracelulares de glutamato que en exceso son excitotóxicas. GS se localiza en astrocitos; sin

embargo, Blondet et al. (1995) han mostrado una subpoblación de astrocitos fuertemente positivos para GFAP pero negativos para GS en ratones Wobbler, lo que sugiere una regulación alterada del ciclo glutamato / glutamina. Los datos de este trabajo confirman los resultados de Blondet et al. (1995) y Meyer et al. (2010), que muestra una reducción parcial de células GS + en la médula espinal del Wobbler. El deterioro de la síntesis de glutamina podría explicar la excitotoxicidad del glutamato en ratones Wobbler (Thielsen et al., 2013). Por otra parte, se ha demostrado también que los oligodendrocitos expresan GS en varias especies como humanos y ratones, (Bernstein et al., 2014). En relación a los resultados obtenidos en ensayos de colocalización, demostramos que en Wobblers predomina una población de astrocitos y oligodendrocitos GS-negativos, mientras que el tratamiento con testosterona restableció la expresión de GS en oligodendrocitos. Debido a que las células inmunorreactivas GS resurgieron después del tratamiento con testosterona, es posible que los cambios en astrocitos y oligodendrocitos se asocien también a menor excitotoxicidad del glutamato.

En relación a la expresión de GFAP, la hiperreactividad de las astrocitos GFAP+ es una característica de la enfermedad de Wobbler (Deniselle et al., 1997). Esto se demostró en parte por la pronunciada astrogliosis GFAP + en las sustancias gris y blanca de la médula espinal cervical de los animales enfermos. Los astrocitos reactivos son una fuente de mediadores inflamatorios; por lo tanto, la reducción de los factores proinflamatorios mediada por testosterona podría deberse en parte a la inhibición de la astrogliosis. Así, los resultados obtenidos en los astrocitos coincidieron con cambios en la expresión de factores proinflamatorios. En Wobblers, se observó un incremento marcado del mRNA para TNF $\alpha$  y TLR4, mientras que la testosterona disminuyó significativamente la expresión de estos factores proinflamatorios. Además, la testosterona aumentó la expresión de TGF $\beta$ 1, un factor bien conocido por sus propiedades antiinflamatorias (Caruso et al., 2019). Por lo tanto, la testosterona ejerció efectos antiinflamatorios en ratones Wobbler. Estos resultados indican claramente que los cambios en los oligodendrocitos y en la mielina se asociaban al aumento de los astrocitos, microglía y al aumento de factores proinflamatorios. Es sabido que la reactividad microglial y astrocitaria convierte a estas células en generadoras de un ambiente inflamatorio que daña a los oligodendrocitos, células muy vulnerables porque carecen de defensas antioxidantes y fácilmente atacables por radicales libres, óxido nítrico y por su alto contenido en hierro (Liddel et al., 2017).

En relación a la expresión de los receptores de esteroides y/o enzimas involucradas en el metabolismo de testosterona, los Wobbler + testosterona mostraron una disminución de la expresión del ARNm para AR, ER $\alpha$  y aromatasa, enzima necesaria para sintetizar estrógenos a partir de andrógenos, y no produjo efecto sobre la expresión del ARNm para la enzima 5 alfa reductasa. Previamente, hemos demostrado que la testosterona aumentó la expresión del receptor Sigma 1, un receptor que une esteroides. Los agonistas de este receptor han sido postulados como agentes neuroprotectores para Wobbler y pacientes con la forma esporádica de ELA (Peviani et al., 2014).

En este trabajo analizamos, también, cómo se moduló la concentración de los esteroides endógenos en el SNC de Wobbler machos luego de tratamiento con testosterona exógena sistémica. Demostramos, que este tratamiento además de incrementar los niveles de testosterona en la médula espinal cervical, aumentó también los niveles de sus metabolitos reducidos: 5 $\alpha$ -DHT, 3 $\alpha$ -androstaneol y 3 $\beta$ -androstaneol. Por tanto, los efectos protectores observados pueden estar

mediados por la molécula madre testosterona y/o sus metabolitos reducidos en el carbono 5 $\alpha$ , que a su vez son moléculas neuroactivas. En contraposición, los niveles de estradiol se encontraron muy por debajo del límite de detección en los Wobblers que recibieron testosterona. Por lo tanto, estos resultados indican que los efectos de la testosterona no dependen de su aromatización a estradiol. En particular, los efectos de los andrógenos sobre los factores inflamatorios podrían ejercerse a través del AR. De hecho, la administración de 5 $\alpha$ -DHT, un andrógeno no aromatizable, modifica el perfil inmune y reduce la inflamación en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y en modelos de neuroinflamación inducida por lipopolisacáridos (LPS) (Spence & Voskuhl, 2012; Yang et al., 2020). Otra evidencia de la participación del AR en la inmunomodulación surge a partir de trabajos que demuestran un bajo efecto protector de este esteroide en presencia del antagonista del AR flutamida (Palaszynski et al., 2004). En este trabajo, a fin de dilucidar el subtipo de receptor involucrado en las acciones neuroprotectoras de la testosterona, determinamos la expresión de los receptores AR y ER $\alpha$  por qPCR, cuyos respectivos ligandos son testosterona o 5 $\alpha$ -DHT (receptor AR) y estradiol o 3 $\beta$ -androstanoediol (ER). Los niveles aumentados del ARNm para ER $\alpha$  y aromatasa que demostramos en Wobblers libres de tratamiento podrían ser parte de un mecanismo reparativo frente a la progresiva neurodegeneración. Sin embargo, la administración de testosterona reguló negativamente aromatasa como ER $\alpha$ . Sin embargo, no podemos descartar efectos del 3 $\beta$ -androstanoediol a través de ER $\beta$ . El ARNm para AR también se redujo por tratamiento androgénico. Sin embargo, hay estudios que demuestran que los efectos de testosterona sobre los oligodendrocitos y proteínas de mielina dependen de la presencia de AR, ya que no se observaron en ratones knockout para AR (Bielecki et al., 2016; Hussain et al., 2013). En este modelo, la administración de testosterona produjo aumento de las proteínas de mielina y del número de oligodendrocitos maduros, efectos que podrían depender en parte de la acción androgénica sobre AR. Nuevos experimentos que utilicen el cotratamiento de testosterona + el antagonista AR, flutamida, serán necesarios para determinar la participación del AR en la patología del Wobbler. En otras neuropatologías, se ha demostrado que el tratamiento con testosterona estimula eficazmente la formación de nueva mielina y revierte el daño de la mielina en las lesiones desmielinizantes crónicas en un modelo por desmielinización por cuprizona (Hussain et al., 2013). Estos autores demostraron un papel clave en la remielinización del SNC a la acción de la testosterona sobre el AR.

En conclusión, a través de este trabajo demostramos que el tratamiento con testosterona ejerció efectos protectores, promielinizantes y antiinflamatorios en la médula espinal cervical de un modelo experimental para la esclerosis lateral amiotrófica, el ratón mutante Wobbler. Entre estos efectos, la testosterona aumentó el trofismo muscular y enlenteció la progresión de la atrofia muscular en las extremidades anteriores. En las células gliales, la testosterona atenuó la reactividad astrogliol y redujo la expresión de factores proinflamatorios. También, este esteroide mostró tener efectos positivos sobre los oligodendrocitos maduros, estructura y proteínas de mielina, los cuales podrían favorecer el proceso de mielinización axonal. Por último, la testosterona moduló negativamente la expresión del AR y ER $\alpha$ , así como también la enzima aromatasa, sin modular la enzima 5 $\alpha$ -reductasa. Para dilucidar los mecanismos que subyacen a la neuroprotección brindada por la testosterona en la médula espinal de Wobbler, será necesario realizar más trabajos de investigación en este tema. Los resultados

presentados señalan a los andrógenos como terapia potencial para las enfermedades neurodegenerativas.

## Conclusión

Es importante destacar que los resultados obtenidos se asociaron a dosis de testosterona exógena que produjeron concentraciones de testosterona en médula espinal de Wobbler dentro del rango fisiológico, ya que fueron similares a la concentración de testosterona en controles. El tratamiento androgénico ejerció efectos protectores en este modelo de ELA, tanto a nivel de la clínica del animal, ya que redujo la progresión de la atrofia en miembros anteriores, así como también a nivel de parámetros moleculares y neuropatológicos. En este sentido, en comparación con los animales Wobbler no tratados, los ratones Wobbler + testosterona mostraron menor actividad astrocitaria GFAP+, menor expresión de factores proinflamatorios y mayor expresión de la enzima GS, lo que puede asociarse a mayor detoxificación del glutamato extracelular. También, mostraron mayor área positiva para la tinción de mielina LFB, inmunoreactividad para MBP y una densidad superior de oligodendrocitos maduros CC1+. A nivel estructural se observó que los axones localizados en sustancia blanca presentaron vainas de mielina de mayor grosor y una proporción g más cercana a valores control, mientras que los Wobbler libres de tratamiento mostraron un grosor de la mielina independiente del diámetro axonal (ver Figura 24).

Todos estos efectos podrían depender de la acción directa de la testosterona sobre el receptor AR, ya que la testosterona no es capaz de producir efectos mielinizantes en ratones knockout para AR. Por otra parte, es importante tener en cuenta que parte de los efectos observados podrían depender de la acción de derivados 5 alfa-reducidos de testosterona como 5a-DHT o 3b-androstanediol, ya que éstos se encontraron elevados en los Wobbler luego del tratamiento con testosterona. Futuros experimentos, que utilicen antagonistas del receptor AR o inhibidores de la enzima 5 alfa reductasa en cotratamiento con testosterona, permitirán dilucidar los mecanismos de acción de este esteroide en la neurodegeneración del Wobbler.

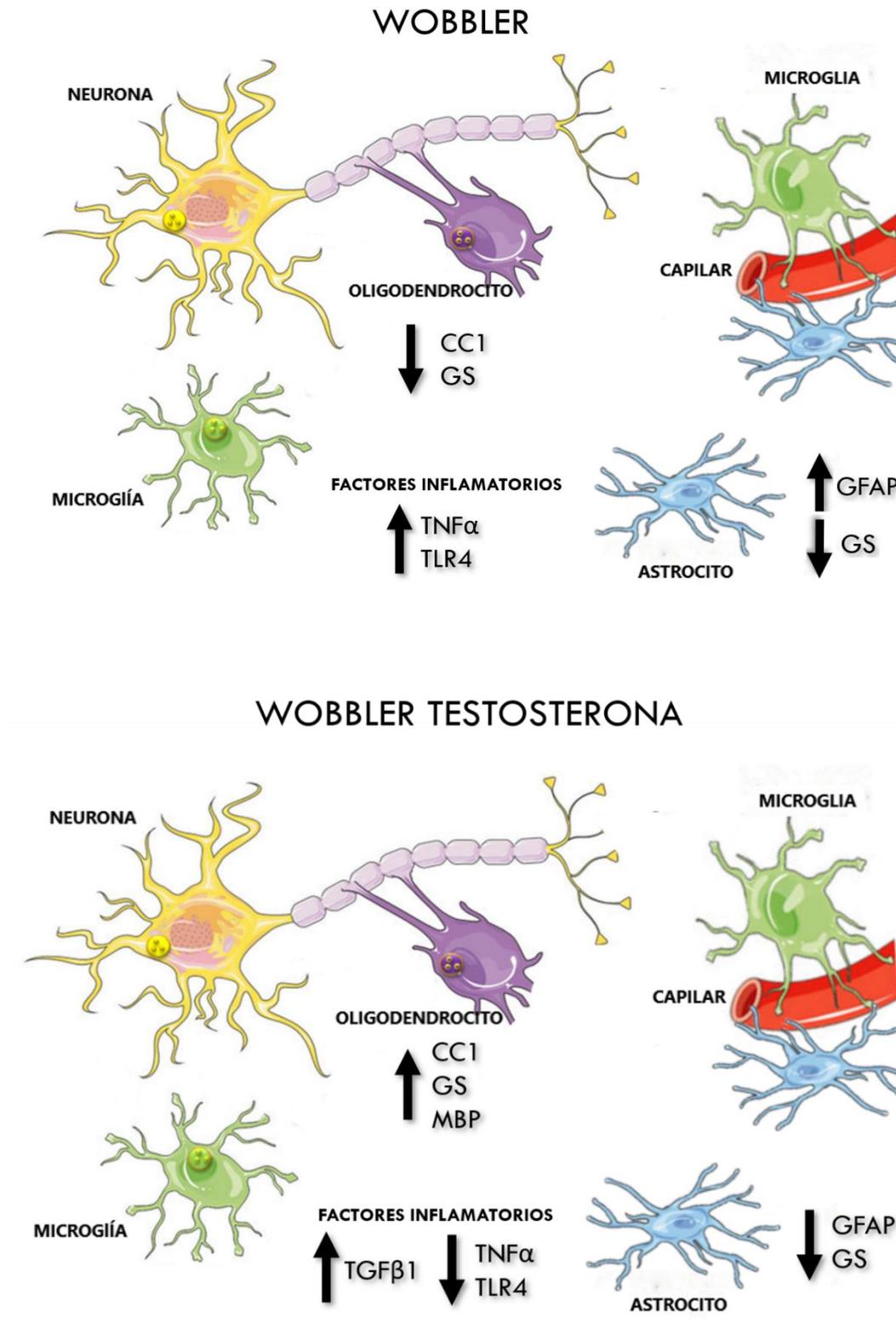


Figura 24. Esquema que resume los resultados obtenidos en este trabajo en Wobbler y Wobbler + testosterona.

## Bibliografía

- Barbeito, L. H., Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Peluffo, H., Viera, L., . . . Beckman, J. S. (2004). A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research Reviews*, *47*(1), 263-274. doi:<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.05.003>
- Baulieu, E. E. (1997). Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res*, *52*, 1-32.
- Baulieu, E. E., & Schumacher, M. (1997). Neurosteroids, with special reference to the effect of progesterone on myelination in peripheral nerves. *Mult Scler*, *3*(2), 105-112. doi:10.1177/135245859700300209
- Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, *81*(2), 871-927. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.871
- Bentvelsen, F. M., McPhaul, M. J., Wilson, C. M., Wilson, J. D., & George, F. W. (1996). Regulation of immunoreactive androgen receptor in the adrenal gland of the adult rat. *Endocrinology*, *137*(7), 2659-2663. doi:10.1210/endo.137.7.8770883
- Bernstein, H.-G., Bannier, J., Meyer-Lotz, G., Steiner, J., Keilhoff, G., Dobrowolny, H., . . . Bogerts, B. (2014). Distribution of immunoreactive glutamine synthetase in the adult human and mouse brain. Qualitative and quantitative observations with special emphasis on extra-astroglial protein localization. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *61-62*, 33-50. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.07.003>
- Bielecki, B., Mattern, C., Ghomari, A. M., Javaid, S., Smietanka, K., Abi Ghanem, C., . . . Traiffort, E. (2016). Unexpected central role of the androgen receptor in the spontaneous regeneration of myelin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(51), 14829. doi:10.1073/pnas.1614826113
- Bigini, P., Diana, V., Barbera, S., Fumagalli, E., Micotti, E., Sitia, L., . . . Cova, L. (2012). Longitudinal tracking of human fetal cells labeled with super paramagnetic iron oxide nanoparticles in the brain of mice with motor neuron disease. *PLoS One*, *7*(2), e32326. doi:10.1371/journal.pone.0032326
- Blakemore, W. F. (1974). Pattern of remyelination in the CNS. *Nature*, *249*(5457), 577-578. doi:10.1038/249577a0
- Blok, L. J., Hoogerbrugge, J. W., Themmen, A. P., Baarends, W. M., Post, M., & Grootegoed, J. A. (1992). Transient down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in Sertoli cells by follicle-stimulating hormone is followed by up-regulation of androgen receptor mRNA and protein. *Endocrinology*, *131*(3), 1343-1349. doi:10.1210/endo.131.3.1324158
- Blondet, B., Hantaz-Ambroise, D., Ait-Ikhlef, A., Cambier, D., Murawsky, M., & Rieger, F. (1995). Astrocytosis in wobbler mouse spinal cord involves a population of astrocytes which is glutamine synthetase-negative. *Neuroscience Letters*, *183*(3), 179-182. doi:[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)11145-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)11145-9)
- Boillee, S., Peschanski, M., & Junier, M. P. (2003). The wobbler mouse: a neurodegeneration jigsaw puzzle. *Mol Neurobiol*, *28*(1), 65-106. doi:10.1385/MN:28:1:65
- Boulpaep, W. B. E. (2016). *Medical Physiology* (Vol. 3): Elsevier.
- Brien, J. S. (1965). Stability of the Myelin Membrane. *Science*, *147*(3662), 1099. doi:10.1126/science.147.3662.1099
- Brocca, M. E., & Garcia-Segura, L. M. (2019). Non-reproductive Functions of Aromatase in the Central Nervous System Under Physiological and Pathological Conditions. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *39*(4), 473-481. doi:10.1007/s10571-018-0607-4
- Bunge, R. P. (1968). Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev*, *48*(1), 197-251. doi:10.1152/physrev.1968.48.1.197
- Burgess, L. H., & Handa, R. J. (1993). Hormonal regulation of androgen receptor mRNA in the brain and anterior pituitary gland of the male rat. *Brain Res Mol Brain Res*, *19*(1-2), 31-38. doi:10.1016/0169-328x(93)90145-f
- Caruso, G., Fresta, C. G., Musso, N., Giambirtone, M., Grasso, M., Spampinato, S. F., . . . Caraci, F. (2019). Carnosine Prevents A $\beta$ -Induced Oxidative Stress and Inflammation in Microglial Cells: A Key Role of TGF- $\beta$ 1. *Cells*, *8*(1). doi:10.3390/cells8010064
- Casano, A. M., & Peri, F. (2015). Microglia: multitasking specialists of the brain. *Dev Cell*, *32*(4), 469-477. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.018
- Clarke, M. V., Russell, P. K., Zajac, J. D., & Davey, R. A. (2019). The androgen receptor in the hypothalamus positively regulates hind-limb muscle mass and voluntary physical activity in adult male mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *189*, 187-194. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.02.018>

- Cleveland, D. W., & Rothstein, J. D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*, 2(11), 806-819. doi:10.1038/35097565
- Cozzolino, M., & Carri, M. T. (2012). Mitochondrial dysfunction in ALS. *Prog Neurobiol*, 97(2), 54-66. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.06.003
- Dahlke, C., Saberi, D., Ott, B., Brand-Saberi, B., Schmitt-John, T., & Theiss, C. (2015). Inflammation and neuronal death in the motor cortex of the wobbler mouse, an ALS animal model. *J Neuroinflammation*, 12, 215. doi:10.1186/s12974-015-0435-0
- Dawson, M. R. L., Polito, A., Levine, J. M., & Reynolds, R. (2003). NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(2), 476-488. doi:[https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00210-0)
- Day, J. R., Frank, A. T., O'Callaghan, J. P., Jones, B. C., & Anderson, J. E. (1998). The effect of age and testosterone on the expression of glial fibrillary acidic protein in the rat cerebellum. *Exp Neurol*, 151(2), 343-346. doi:10.1006/exnr.1998.6801
- Delisle, M. B., & Carpenter, S. (1984). Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 63(2), 241-250. doi:10.1016/0022-510x(84)90199-0
- Deniselle, M. C. G., González, S., Piroli, G., Ferrini, M., Lima, A. E., & De Nicola, A. F. (1997). Glucocorticoid receptors and actions in the spinal cord of the Wobbler mouse, a model for neurodegenerative diseases. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 60(3), 205-213. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(96\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(96)00193-8)
- DonCarlos, L. L., Sarkey, S., Lorenz, B., Azcoitia, I., Garcia-Ovejero, D., Huppenbauer, C., & Garcia-Segura, L. M. (2006). Novel cellular phenotypes and subcellular sites for androgen action in the forebrain. *Neuroscience*, 138(3), 801-807. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.020>
- Duchen, L. W., & Strich, S. J. (1968). An hereditary motor neurone disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant 'wobbler'. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 31(6), 535-542. doi:10.1136/jnnp.31.6.535
- Dutta, R., & Trapp, B. D. (2007). Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. 68(22 suppl 3), S22-S31. doi:10.1212/01.wnl.0000275229.13012.32 %J Neurology
- Elbaz, B., & Popko, B. (2019). Molecular Control of Oligodendrocyte Development. *Trends Neurosci*, 42(4), 263-277. doi:10.1016/j.tins.2019.01.002
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240(4854), 889-895. doi:10.1126/science.3283939
- Falconer, D. J. M. N. L. (1956). Wobbler (wr). 15, 23.
- Fancy, S. P., Chan, J. R., Baranzini, S. E., Franklin, R. J., & Rowitch, D. H. (2011). Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci*, 34, 21-43. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113629
- Fancy, S. P. J., Chan, J. R., Baranzini, S. E., Franklin, R. J. M., & Rowitch, D. H. (2011). Myelin Regeneration: A Recapitulation of Development? *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 21-43. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113629
- Franklin, R. J. M., & ffrench-Constant, C. (2017). Regenerating CNS myelin — from mechanisms to experimental medicines. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(12), 753-769. doi:10.1038/nrn.2017.136
- Ghoumari, A. M., Abi Ghanem, C., Asbelaoui, N., Schumacher, M., & Hussain, R. (2020). Roles of Progesterone, Testosterone and Their Nuclear Receptors in Central Nervous System Myelination and Remyelination. *Int J Mol Sci*, 21(9). doi:10.3390/ijms21093163
- Gkikas, D., Tsampoula, M., & Politis, P. K. (2017). Nuclear receptors in neural stem/progenitor cell homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(22), 4097-4120. doi:10.1007/s00018-017-2571-4
- Gonatas, N. K., Stieber, A., Mourelatos, Z., Chen, Y., Gonatas, J. O., Appel, S. H., . . . Hawu, J. J. (1992). Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol*, 140(3), 731-737.
- Gonzalez Deniselle, M. C., Carreras, M. C., Garay, L., Gargiulo-Monachelli, G., Meyer, M., Poderoso, J. J., & De Nicola, A. F. (2012). Progesterone prevents mitochondrial dysfunction in the spinal cord of wobbler mice. *J Neurochem*, 122(1), 185-195. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07753.x
- Gonzalez Deniselle, M. C., Garay, L., Gonzalez, S., Guennoun, R., Schumacher, M., & De Nicola, A. F. (2005). Progesterone restores retrograde labeling of cervical motoneurons in Wobbler mouse motoneuron disease. *Experimental Neurology*, 195(2), 518-523. doi:<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.06.015>

- Gonzalez Deniselle, M. C., Liere, P., Pianos, A., Meyer, M., Aprahamian, F., Cambourg, A., . . . Guennoun, R. (2016). Steroid Profiling in Male Wobbler Mouse, a Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Endocrinology*, *157*(11), 4446-4460. doi:10.1210/en.2016-1244
- Gonzalez Deniselle, M. C., López-Costa, J. J., Saavedra, J. P., Pietranera, L., Gonzalez, S. L., Garay, L., . . . De Nicola, A. F. (2002). Progesterone neuroprotection in the Wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease. *Neurobiol Dis*, *11*(3), 457-468. doi:10.1006/nbdi.2002.0564
- Guegan, C., Vila, M., Rosoklija, G., Hays, A. P., & Przedborski, S. (2001). Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, *21*(17), 6569-6576.
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., . . . et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, *264*(5166), 1772-1775. doi:10.1126/science.8209258
- Hadwin, T. P. (1993). Textbook of biochemistry with clinical correlations: (Third Edition) Edited by T M Devlin. pp 1185. Wiley-Liss, New York. 1992. £37.50/\$72.50 (cloth), £24.95/\$44.95 (pbk). *Biochemical Education*, *21*(1), 50-51. doi:[https://doi.org/10.1016/0307-4412\(93\)90024-T](https://doi.org/10.1016/0307-4412(93)90024-T)
- Hartline, D. K. (2008). What is myelin? *Neuron Glia Biol*, *4*(2), 153-163. doi:10.1017/S1740925X09990263
- Hattingen, E., Magerkurth, J., Pilatus, U., Mozer, A., Seifried, C., Steinmetz, H., . . . Hilker, R. (2009). Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopy demonstrates mitochondrial dysfunction in early and advanced Parkinson's disease. *Brain*, *132*(Pt 12), 3285-3297. doi:10.1093/brain/awp293
- Heck, A. L., & Handa, R. J. (2019). Sex differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis' response to stress: an important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology*, *44*(1), 45-58. doi:10.1038/s41386-018-0167-9
- Hussain, R., Ghomari, A. M., Bielecki, B., Steibel, J., Boehm, N., Liere, P., . . . Ghandour, M. S. (2013). The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination. *Brain*, *136*(1), 132-146. doi:10.1093/brain/aws284
- Ikeda, K., & Iwasaki, Y. (2015). Edaravone, a Free Radical Scavenger, Delayed Symptomatic and Pathological Progression of Motor Neuron Disease in the Wobbler Mouse. *PLoS One*, *10*(10), e0140316. doi:10.1371/journal.pone.0140316
- Iqbal, M. J., Dalton, M., & Sawers, R. S. (1983). Binding of testosterone and oestradiol to sex hormone binding globulin, human serum albumin and other plasma proteins: evidence for non-specific binding of oestradiol to sex hormone binding globulin. *Clin Sci (Lond)*, *64*(3), 307-314. doi:10.1042/cs0640307
- Jackman, N., Ishii, A., & Bansal, R. (2009). Oligodendrocyte development and myelin biogenesis: parsing out the roles of glycosphingolipids. *Physiology (Bethesda)*, *24*, 290-297. doi:10.1152/physiol.00016.2009
- Jockusch, H., Holland, A., Staunton, L., Schmitt-John, T., Heimann, P., Dowling, P., & Ohlendieck, K. (2014). Pathoproteomics of testicular tissue deficient in the GARP component VPS54: the wobbler mouse model of globozoospermia. *Proteomics*, *14*(7-8), 839-852. doi:10.1002/pmic.201300189
- Jockusch, H., Holland, A., Staunton, L., Schmitt-John, T., Heimann, P., Dowling, P., & Ohlendieck, K. (2014). Pathoproteomics of testicular tissue deficient in the GARP component VPS54: The wobbler mouse model of globozoospermia. *PROTEOMICS*, *14*(7-8), 839-852. doi:<https://doi.org/10.1002/pmic.201300189>
- Johri, A., & Beal, M. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Exp Ther*, *342*(3), 619-630. doi:10.1124/jpet.112.192138
- Kessarar, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci*, *9*(2), 173-179. doi:10.1038/nn1620
- Kevorkian, R. T., & Morley, J. E. (2003). The Aging Male Reproductive System. In R. Aspinall (Ed.), *Aging of the Organs and Systems* (pp. 293-308). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Kumar, V. L., Majumder, P. K., & Kumar, V. (1997). Androgen deprivation causes up-regulation of androgen receptor transcript in the rat prostate. *Mol Cell Biochem*, *171*(1-2), 133-138. doi:10.1023/a:1006805503284
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., . . . Nave, K. A. (2003). Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet*, *33*(3), 366-374. doi:10.1038/ng1095
- Lassmann, H., Brück, W., & Lucchinetti, C. F. (2007). The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview. *17*(2), 210-218. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x

- Lee, J. Y., Lee, J. D., Phipps, S., Noakes, P. G., & Woodruff, T. M. (2015). Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) extends survival in the hSOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*, *12*, 90. doi:10.1186/s12974-015-0310-z
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., . . . Rothstein, J. D. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, *487*(7408), 443-448. doi:10.1038/nature11314
- Leifke, E., Gorennoi, V., Wichers, C., Von Zur Muhlen, A., Von Buren, E., & Brabant, G. (2000). Age-related changes of serum sex hormones, insulin-like growth factor-1 and sex-hormone binding globulin levels in men: cross-sectional data from a healthy male cohort. *Clin Endocrinol (Oxf)*, *53*(6), 689-695. doi:10.1046/j.1365-2265.2000.01159.x
- Leigh, P. N., & Swash, M. (1991). Cytoskeletal pathology in motor neuron diseases. *Adv Neurol*, *56*, 115-124.
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., . . . Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481-487. doi:10.1038/nature21029
- Liere, P., Akwa, Y., Weill-Engerer, S., Eychenne, B., Pianos, A., Robel, P., . . . Baulieu, E.-E. (2000). Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, *739*, 301-312. doi:10.1016/S0378-4347(99)00563-0
- Mackenzie, I. R., Bigio, E. H., Ince, P. G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N. J., . . . Trojanowski, J. Q. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol*, *61*(5), 427-434. doi:10.1002/ana.21147
- Mackenzie, I. R., Rademakers, R., & Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*, *9*(10), 995-1007. doi:10.1016/S1474-4422(10)70195-2
- Macrez, R., Stys, P. K., Vivien, D., Lipton, S. A., & Docagne, F. (2016). Mechanisms of glutamate toxicity in multiple sclerosis: biomarker and therapeutic opportunities. *Lancet Neurol*, *15*(10), 1089-1102. doi:10.1016/S1474-4422(16)30165-X
- Meyer, M., Garay, L. I., Kruse, M. S., Lara, A., Gargiulo-Monachelli, G., Schumacher, M., . . . Gonzalez Deniselle, M. C. (2017). Protective effects of the neurosteroid allopregnanolone in a mouse model of spontaneous motoneuron degeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *174*, 201-216. doi:10.1016/j.jsmb.2017.09.015
- Meyer, M., Gonzalez Deniselle, M. C., Garay, L. I., Monachelli, G. G., Lima, A., Roig, P., . . . De Nicola, A. F. (2010). Stage dependent effects of progesterone on motoneurons and glial cells of wobbler mouse spinal cord degeneration. *Cell Mol Neurobiol*, *30*(1), 123-135. doi:10.1007/s10571-009-9437-8
- Meyer, M., Gonzalez Deniselle, M. C., Garay, L. I., Monachelli, G. G., Lima, A., Roig, P., . . . De Nicola, A. F. (2010). Stage Dependent Effects of Progesterone on Motoneurons and Glial Cells of Wobbler Mouse Spinal Cord Degeneration. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *30*(1), 123-135. doi:10.1007/s10571-009-9437-8
- Meyer, M., Gonzalez Deniselle, M. C., Gargiulo-Monachelli, G., Garay, L. I., Schumacher, M., Guennoun, R., & De Nicola, A. F. (2012). Progesterone effects on neuronal brain-derived neurotrophic factor and glial cells during progression of Wobbler mouse neurodegeneration. *Neuroscience*, *201*, 267-279. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.034>
- Miller, R. H. (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol*, *67*(6), 451-467. doi:10.1016/s0301-0082(02)00058-8
- Mitsumoto, H., Ikeda, K., Holmlund, T., Greene, T., Cedarbaum, J. M., Wong, V., & Lindsay, R. M. (1994). The effects of ciliary neurotrophic factor on motor dysfunction in wobbler mouse motor neuron disease. *Ann Neurol*, *36*(2), 142-148. doi:<https://doi.org/10.1002/ana.410360205>
- Monje, M. (2018). Myelin Plasticity and Nervous System Function. *Annu Rev Neurosci*, *41*, 61-76. doi:10.1146/annurev-neuro-080317-061853
- Moore, C. S., Abdullah, S. L., Brown, A., Arulpragasam, A., & Crocker, S. J. (2011). How factors secreted from astrocytes impact myelin repair. *89*(1), 13-21. doi:10.1002/jnr.22482
- Moser, J. M., Bigini, P., & Schmitt-John, T. (2013). The wobbler mouse, an ALS animal model. *Mol Genet Genomics*, *288*(5-6), 207-229. doi:10.1007/s00438-013-0741-0
- Moser, J. M., Bigini, P., & Schmitt-John, T. (2013). The wobbler mouse, an ALS animal model. *Molecular genetics and genomics : MGG*, *288*(5-6), 207-229. doi:10.1007/s00438-013-0741-0
- Mulder, D. W., Kurland, L. T., Offord, K. P., & Beard, C. M. (1986). Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, *36*(4), 511-517. doi:10.1212/wnl.36.4.511

- Nave, K.-A., & Trapp, B. D. (2008). Axon-Glial Signaling and the Glial Support of Axon Function. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 535-561. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094309
- Nave, K. A., & Werner, H. B. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 503-533. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013101
- Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., & Filip, M. (2016). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*, 53(6), 4094-4125. doi:10.1007/s12035-015-9337-5
- Nonneman, A., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2014). The role of oligodendroglial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis Manag*, 4(3), 223-239. doi:10.2217/nmt.14.21
- Norman, A. W., Mizwicki, M. T., & Norman, D. P. (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*, 3(1), 27-41. doi:10.1038/nrd1283
- Palaszynski, K. M., Loo, K. K., Ashouri, J. F., Liu, H.-b., & Voskuhl, R. R. (2004). Androgens are protective in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 146(1), 144-152. doi:10.1016/j.jneuroim.2003.11.004
- Palmisano, R., Golfi, P., Heimann, P., Shaw, C., Troakes, C., Schmitt-John, T., & Bartsch, J. W. (2011). Endosomal accumulation of APP in wobbler motor neurons reflects impaired vesicle trafficking: implications for human motor neuron disease. *BMC Neurosci*, 12, 24. doi:10.1186/1471-2202-12-24
- Peterziel, H., Mink, S., Schonert, A., Becker, M., Klocker, H., & Cato, A. C. (1999). Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene*, 18(46), 6322-6329. doi:10.1038/sj.onc.1203032
- Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G. G., & Gustafsson, J. A. (1997). Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*, 11(10), 1486-1496. doi:10.1210/mend.11.10.9989
- Peviani, M., Salvaneschi, E., Bontempi, L., Petese, A., Manzo, A., Rossi, D., . . . Curti, D. (2014). Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation. *Neurobiol Dis*, 62, 218-232. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.010>
- Pike, C. J. (1999). Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 72(4), 1552-1563. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.721552.x
- Pike, C. J. (2001). Testosterone attenuates beta-amyloid toxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res*, 919(1), 160-165. doi:10.1016/s0006-8993(01)03024-4
- Piroli, G. G., Pietranera, L., Grillo, C. A., & De Nicola, A. F. (2002). Dehydroepiandrosterone regulation of prolactin gene expression in the anterior pituitary does not depend on galanin induction. *Neuro Endocrinol Lett*, 23(4), 321-324.
- Poloni, M., Facchetti, D., Mai, R., Micheli, A., Agnoletti, L., Francolini, G., . . . Bachetti, T. (2000). Circulating levels of tumour necrosis factor- $\alpha$  and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 287(3), 211-214. doi:[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01177-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01177-0)
- Raasakka, A., & Kursula, P. (2014). The myelin membrane-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: on a highway to structure and function. *Neurosci Bull*, 30(6), 956-966. doi:10.1007/s12264-013-1437-5
- Raff, M. C., Lillien, L. E., Richardson, W. D., Burne, J. F., & Noble, M. D. (1988). Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature*, 333(6173), 562-565. doi:10.1038/333562a0
- Rasband, M. N., & Peles, E. (2015). The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(3), a020495. doi:10.1101/cshperspect.a020495
- Rathke-Hartlieb, S., Schmidt, V. C., Jockusch, H., Schmitt-John, T., & Bartsch, J. W. (1999). Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse. *Neuroreport*, 10(16), 3411-3416.
- Ratliff, W. A., Saykally, J. N., Kane, M. J., & Citron, B. A. (2018). Neuromuscular Junction Morphology and Gene Dysregulation in the Wobbler Model of Spinal Neurodegeneration. *J Mol Neurosci*, 66(1), 114-120. doi:10.1007/s12031-018-1153-8
- Rosch, P. J. (1995). Hormones and aging. Edited by P.S. Timiras, W.D. uay and A. vrnadakis, CRC press, Boca Raton, FL, 1995. No. of pages: 438. Price: \$110.00. 11(1), 271-271. doi:<https://doi.org/10.1002/smi.2460110143>

- Saab, A. S., Tzvetanova, I. D., & Nave, K.-A. (2013). The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(6), 1065-1072. doi:<https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.09.008>
- Schmitt-John, T. (2015). VPS54 and the wobbler mouse. *Front Neurosci*, 9, 381. doi:10.3389/fnins.2015.00381
- Schmitt, S., Cantuti Castelvetri, L., & Simons, M. (2015). Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(8), 999-1005. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.016>
- Shaw, P. J., Forrest, V., Ince, P. G., Richardson, J. P., & Wastell, H. J. (1995). CSF and Plasma Amino Acid Levels in Motor Neuron Disease: Elevation of CSF Glutamate in a Subset of Patients. *Neurodegeneration*, 4(2), 209-216. doi:<https://doi.org/10.1006/neur.1995.0026>
- Sica, & Dubrovsky. (2001). Esclerosis Lateral Amiotrófica y enfermedades relacionadas. *Editorial Científica Americana*.
- Silvia, G., Mariaserena, B., Roberto Cosimo, M., & Barbara, V. (2012). Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 49(3), R125-R134. doi:10.1530/JME-12-0127
- Spence, R. D., & Voskuhl, R. R. (2012). Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(1), 105-115. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.12.001>
- Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., & Simons, M. (2019). Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol Rev*, 99(3), 1381-1431. doi:10.1152/physrev.00031.2018
- Tetsuka, M., & Hillier, S. G. (1996). Androgen receptor gene expression in rat granulosa cells: the role of follicle-stimulating hormone and steroid hormones. *Endocrinology*, 137(10), 4392-4397. doi:10.1210/endo.137.10.8828500
- Thielsen, K. D., Moser, J. M., Schmitt-John, T., Jensen, M. S., Jensen, K., & Holm, M. M. (2013). The Wobbler mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) displays hippocampal hyperexcitability, and reduced number of interneurons, but no presynaptic vesicle release impairments. *PLoS One*, 8(12), e82767. doi:10.1371/journal.pone.0082767
- Tortelli, R., Zecca, C., Piccininni, M., Benmahamed, S., Dell'Abate, M. T., Barulli, M. R., . . . Logroscino, G. (2020). Plasma Inflammatory Cytokines Are Elevated in ALS. *11*(1328). doi:10.3389/fneur.2020.552295
- Traiffort, E., Kassoussi, A., Zahaf, A., & Laouarem, Y. (2020). Astrocytes and Microglia as Major Players of Myelin Production in Normal and Pathological Conditions. *Front Cell Neurosci*, 14, 79. doi:10.3389/fncel.2020.00079
- Wenk, M. R. (2005). The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov*, 4(7), 594-610. doi:10.1038/nrd1776
- Xu, L., Liu, T., Liu, L., Yao, X., Chen, L., Fan, D., . . . Wang, S. (2020). Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology*, 267(4), 944-953. doi:10.1007/s00415-019-09652-y
- Yang, L., Zhou, R., Tong, Y., Chen, P., Shen, Y., Miao, S., & Liu, X. (2020). Neuroprotection by dihydrotestosterone in LPS-induced neuroinflammation. *Neurobiol Dis*, 140, 104814. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104814>
- Yingjun LIU, J. Z. (2013). Oligodendrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Biology*, 8(127-133). doi:<https://doi.org/10.1007/s11515-013-1260-4>
- Yoo, Y.-E., & Ko, C.-P. (2012). Dihydrotestosterone Ameliorates Degeneration in Muscle, Axons and Motoneurons and Improves Motor Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Mice. *PLOS ONE*, 7(5), e37258. doi:10.1371/journal.pone.0037258
- Zalc, B., Goujet, D., & Colman, D. (2008). The origin of the myelination program in vertebrates. *Curr Biol*, 18(12), R511-512. doi:10.1016/j.cub.2008.04.010
- Zigmond, M. J., Rowland, L. P., & Coyle, J. T. (2014). Neurobiology of brain disorders: Biological basis of neurological and psychiatric disorders. 1-801.

## Apéndice

Grupos	Andrógenos en la médula espinal cervical (ng/g) (media $\pm$ SEM)				
	Testosterona	5 $\alpha$ -DHT	3 $\alpha$ 5 $\alpha$ DHT	3 $\beta$ 5 $\alpha$ THT	Androstenediona
Control	2.690 $\pm$ 0.640	0.232 $\pm$ 0.043	0.042 $\pm$ 0.010	0.099 $\pm$ 0.020	0.640 $\pm$ 0.100
Wobbler	0.280 $\pm$ 0.130 ***	0.032 $\pm$ 0.007 **	0.022 $\pm$ 0.008	0.009 $\pm$ 0.005 *	0.210 $\pm$ 0.030 **
Wobbler + Testosterona	2.090 $\pm$ 0.340 #	0.281 $\pm$ 0.040 ##	0.089 $\pm$ 0.019 #	0.200 $\pm$ 0.030 ###	0.420 $\pm$ 0.070

Tabla sup. 1. Resultados del estudio de andrógenos por cromatografía gaseosa / espectrometría de masas (GC/MS). Datos representados como media  $\pm$  SEM. \* vs Control; # vs Wobbler.