



Universidad de Oviedo



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

**“Participación del enzima mitocondrial SOD2 en
los mecanismos de diferenciación de
espermatogonias en el testículo”**

Vanesa Cepas López

Trabajo Fin de Máster

10 de julio de 2015

En primer lugar quisiera agradecerle a mi tutora, Rosa Sáinz, haberme brindado la oportunidad de entrar en el laboratorio y realizar este Trabajo Fin de Máster, confiando en mí desde el primer momento.

Pero, este trabajo lleva detrás también muchas horas de ayuda y guía de mis “otros tutores”, Juan Carlos Mayo y David Hevia, a los que también doy las gracias por todos sus esfuerzos y mis preguntas de novata.

Todos los largos días en el laboratorio no serían lo mismo sin mis compañeros, a los que tengo tanto que agradecerles. A las que se fueron: Ana, por enseñarme todo lo que sé, gran parte de este trabajo no se habría realizado sin ti; Henar por su buen humor y su alegría contagiosa, sin ti nada es lo mismo; y Aida por todas las tonterías de los viernes (o cualquier otro día) reflejadas en forma de post-it en la pared. Los que se quedan: Pedro por su paciencia y ayuda en todo momento; Iván por ponerme las pilas y sus cánticos celestiales; y Alejandro y Sergio (a.k.a. Zipi y Zape) por todos sus despropósitos y sin sentidos y el quién se mete más con quién.

También quiero dar las gracias a Armando, Alejandro, Javi, Laura y Marta, por las horas de la comida y el empezar comentando un tema y terminar hablando de otro completamente diferente, realmente conseguís que “desconecte”.

Sin olvidarme de las chicas del animalario y morfología, porque sin ellas no hubiese podido conseguir ninguna muestra para realizar este trabajo. Y a Marta, por toda su ayuda y todo lo que me enseñó con el confocal.

A mis amigos, Ana, Carla, Darío, Helena, Rocío y Thalía no puedo menos que agradecerles su apoyo incondicional y porque aunque este año estemos lejos no se ha perdido la amistad tan bonita que nos une.

Y por último y no por ello menos importante, dar unas gracias enormes a mi familia, en especial a mi hermana, porque aunque me dé muchos disgustos, hay que quererla igual. Y a mis padres, por todo el cariño y porque sin vosotros nunca hubiese llegado a ser la bichicóloga que soy hoy.

A todos, muchísimas gracias.

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Testículos	4
2.1.1. Estructura del testículo	4
2.1.2. Tipos celulares del testículo	5
2.1.3. Espermatogénesis	6
2.1.4. Regulación de la espermatogénesis por andrógenos	10
2.2. Especies reactivas de oxígeno (EROs)	11
2.2.1. Producción de especies reactivas de oxígeno	11
2.2.2. Fuentes de especies reactivas de oxígeno	12
2.2.3. Sistemas antioxidantes celulares	13
2.2.4. SOD2	13
3. Objetivos	15
4. Materiales y métodos	17
4.1. Modelo murino	18
4.1.1. Establecimiento y mantenimiento de la colonia	18
4.1.2. Genotipado	18
4.1.3. Diseño experimental	20
4.2. Análisis morfológico	20
4.2.1. Fijación e inclusión de los tejidos	20
4.2.2. Tinciones de rutina	20
4.2.3. Inmunofluorescencia	21
4.2.4. Microscopía confocal	22
4.2.5. Recuento celular	22
4.3. Estudios moleculares	22
4.3.1. Extracción y cuantificación de ARN	22
4.3.2. RT-PCR y cuantificación del ADNc	23
4.3.3. PCR semicuantitativa	23

	<i>Índice</i>
4.3.4. <i>PCR cuantitativa</i>	25
4.3.5. <i>Extracción y cuantificación de proteínas</i>	25
4.3.6. <i>Western blot</i>	26
4.4. Análisis estadístico	26
5. Bibliografía	27

A horizontal rectangular banner with a dark background. The background is filled with a dense field of small, bright blue, circular spots, resembling a microscopic view of stained cells or a starry night sky. The word "Resumen" is centered in the banner in a white, bold, sans-serif font.

Resumen

La regulación redox por especies reactivas de oxígeno (EROs) tiene un papel fundamental en la señalización celular ya que participa en las decisiones de proliferación y diferenciación celular. La espermatogénesis es un proceso complejo que involucra tanto la auto-renovación de las células madre espermatogónicas como su diferenciación en espermatozoides haploides maduros. La señal de diferenciación de este proceso incluye la modulación de los niveles de EROs. Así, la expresión de enzimas antioxidantes, incluyendo las superóxido dismutasas (SOD), que controlan la producción de H_2O_2 , podría tener un papel fisiológico en espermatogénesis. De forma adicional, se asume que niveles descontrolados de EROs podrían afectar la producción de espermatozoides.

Con el fin de estudiar la participación de la SOD2/MnSOD en este proceso, se emplearon ratones WT C57BL6/J, así como ratones SOD2^{+/-} y SOD2^{+/+}. Los ratones se sacrificaron a las 6 semanas, justo antes de alcanzar la madurez sexual, y a las 10 y 24 semanas de edad. Los testículos fueron extraídos y conservados para estudios inmunohistoquímicos y de biología molecular. Las secciones de testículo se tiñeron con DAPI para visualizar la morfología nuclear y se observaron a microscopía confocal para llevar a cabo un recuento de células espermatogónicas. De forma adicional, se extrajo su ARNm y se empleó para llevar a cabo una PCR semicuantitativa para analizar los niveles de expresión de PGP9.5, Sycp3 y Shippo1 como marcadores de espermatogonias, espermatoцитos y células haploides, respectivamente. Finalmente también se realizó una PCR cuantitativa y una inmunofluorescencia para el receptor de andrógenos (AR).

A horizontal rectangular banner with a dark background. The background is filled with a dense field of small, bright blue, circular spots, resembling a microscopic view of stained cells or a starry night sky. The word "Introducción" is centered in white, bold, sans-serif font.

Introducción

1. Testículos

Los testículos son órganos ovoides pares del aparato reproductor masculino. Se encuentran alojados, en el caso de los roedores, dentro de la cavidad abdominal y, en el caso de los humanos, fuera de ésta, en el escroto [1]. Sus dos funciones principales son la producción de gametos masculinos o espermatozoides (espermatogénesis) y la síntesis de hormonas sexuales masculinas o andrógenos (esteroidogénesis). Los andrógenos, principalmente la testosterona, son indispensables para la espermatogénesis ya que cumplen una función importante en la adquisición del fenotipo masculino por el embrión y son la causa de las características físicas y psicológicas masculinas (dimorfismo sexual).

1.1. Estructura del testículo

Los testículos están recubiertos por una cápsula gruesa de tejido conjuntivo denso denominada túnica albugínea que contiene vasos sanguíneos en su parte interna. Cada testículo está dividido en unos 250 lobulillos por tabiques incompletos de tejido conjuntivo que se proyectan desde la cápsula (Figura 1).

Cada uno de estos lobulillos testiculares está formado por un estroma de tejido conjuntivo que envuelve de 1 a 4 túbulos seminíferos que se encuentran muy contorneados y se pliegan sobre sí mismos, continuando con la *rete testis*. Estos túbulos en ratones tienen una longitud de 13 cm y un diámetro de 100 μm , mientras que en humanos tienen una longitud de unos 50 cm y un diámetro de entre 150 y 250 μm [2].

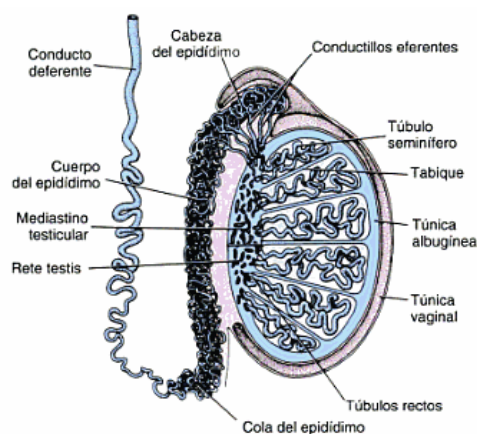


Figura 1. Anatomía del testículo. Tomada de [2].

El testículo posee una lámina propia formada por tejido conjuntivo multiestratificado. En los roedores está compuesta por una única capa de células mioides y fibrillas colágenas, mientras que en el ser humano aparecen de tres a cinco capas.

Además, en cada túbulo, se forma una barrera hematotesticular (BTB) como consecuencia de las uniones especializadas que se dan entre células de Sertoli (Figura 2), que lo divide en un compartimento basal (en el que quedan restringidas las espermatogonias y espermatocitos primarios) y otro adluminal (en el que se encuentran los espermatocitos secundarios y las espermatidas) [3]. Esta barrera, además, tiene como función aislar las células espermatogénicas del sistema inmunitario, ya que la composición del líquido en los túbulos seminíferos y las vías espermáticas difiere considerablemente de la composición del plasma sanguíneo y de la linfa testicular.

1.2. Tipos celulares del testículo

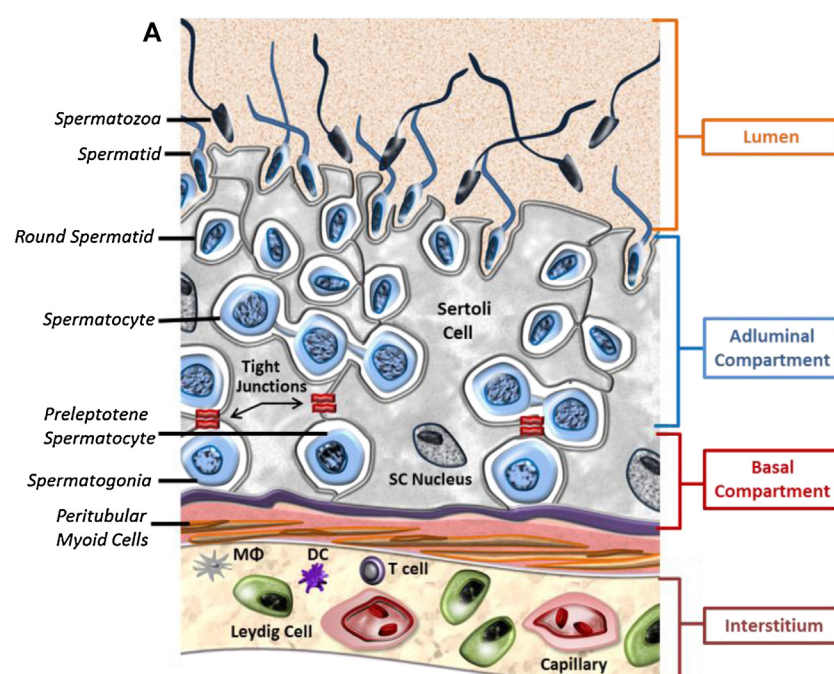


Figura 2. Histología del túbulo seminífero. Tomada de [5].

El testículo está compuesto por varios tipos celulares, como se observa en la Figura 2:

- Células mioideas peritubulares: se encuentran rodeando la pared externa del túbulo, se contraen de forma rítmica creando ondas peristálticas que contribuyen al movimiento de los espermatozoides y el líquido testicular a lo largo de los túbulos seminíferos hacia las vías espermáticas [4].
- Células de Leydig: son células poliédricas de gran tamaño que se encuentran en el espacio intersticial entre los túbulos seminíferos. Secretan testosterona desde las

primeras etapas de la vida fetal que bien puede difundir hacia el túbulo seminífero o hacia los vasos sanguíneos del espacio intersticial [3].

- Células de Sertoli: son células de sostén con una morfología cilíndrica y unas prolongaciones apicales y laterales extensas que se propagan desde la membrana basal hasta el lumen del túbulo rodeando a las células germinales en diferenciación [3]. Se encuentran a lo largo de todo el espesor del epitelio seminífero y no se dividen después de la pubertad.

Intervienen en el intercambio de sustratos y desechos metabólicos entre las células espermatogénicas y el sistema circulatorio. Además, transmiten señales externas y proveen factores requeridos para la proliferación y diferenciación de estas células al secretar proteína fijadora de andrógenos (ABP) que concentra la testosterona en el compartimento adluminal del túbulo seminífero [2]. También fagocitan y degradan los cuerpos residuales que se forman en la última etapa de la espermiogénesis así como cualquier célula espermatogénica que no llegue a diferenciarse por completo [5].

- Células espermatogénicas: son células que se dividen y se diferencian con regularidad en espermatozoides maduros. Derivan de células germinativas primordiales originadas en el saco vitelino que colonizan las crestas gonadales durante la etapa inicial del desarrollo de los testículos. Se organizan en capas mal definidas de desarrollo progresivo. Existen cuatro tipos principales según su grado de diferenciación: espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides.

1.3. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso por el cual se producen los espermatozoides, comienza poco antes de la pubertad bajo la influencia de las concentraciones cada vez mayores de gonadotrofinas hipofisarias y continúa durante toda la vida. Es un proceso de división y diferenciación de las células germinales masculinas que ocurre dentro de los túbulos seminíferos del testículo [3]. Se divide en tres fases distintas:

- Fase espermatogónica o mitótica: en ella las espermatogonias se dividen por mitosis para reemplazarse a sí mismas y se diferencian en espermatocitos primarios.

Las células madre de las espermatogonias (SSC) se consideran células individuales localizadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos. En roedores, estas células se denominan espermatogonias A “single” (A_s) y sufren divisiones mitóticas con frecuencia, pudiendo originar nuevas SSC para mantener el reservorio de estas células o, por el contrario, dividirse para transformarse en espermatogonias más diferenciadas [3, 6-8].

De esta forma, una espermatogonia A_s puede formar dos espermatogonias en diferenciación que permanecen conectadas mediante un puente intercelular, denominadas A “paired” (A_{pr}). Éstas, se expanden de forma clonal mediante divisiones mitóticas formando cadenas de 4, 8, 16 y 32 espermatogonias A “aligned” (A_{al}). En la literatura, con frecuencia, se refiere a las espermatogonias A_s , A_{pr} y A_{al} como espermatogonias indiferenciadas [9].

Las espermatogonias A_{al} se diferencian sin dividirse en espermatogonias A_1 , que se dividen de forma mitótica para formar cadenas de espermatogonias A_2 , A_3 , A_4 , intermedias y, finalmente, B [9, 10] (Figura 3).

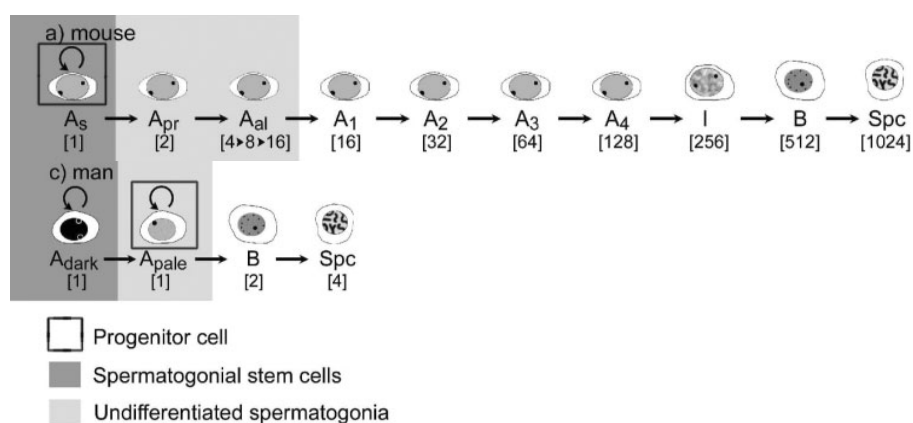


Figura 3. Representación esquemática de la fase espermatogónica en ratones y humanos. Tomada de [11], con modificaciones.

Estas espermatogonias B sufren la última división mitótica para dar lugar a los espermatocitos primarios.

Por el contrario, en humanos, se encuentran dos tipos de poblaciones diferentes de espermatogonias A. Por un lado están las oscuras (A_d) que son las células madre del epitelio seminífero, se dividen para dar lugar a un par de espermatogonias A_d o a un par de espermatogonias claras (A_p). Éstas están predestinadas a seguir el proceso de diferenciación, por lo que sufren varias divisiones mitóticas consecutivas y se diferencian en espermatogonias B (Figura 3).

- Fase espermatocítica o meiótica: durante la cual los espermatocitos primarios sufren dos divisiones meióticas para reducir la cantidad de cromosomas y el contenido en ADN, dando lugar a células haploides denominadas espermátidas (Figura 4).

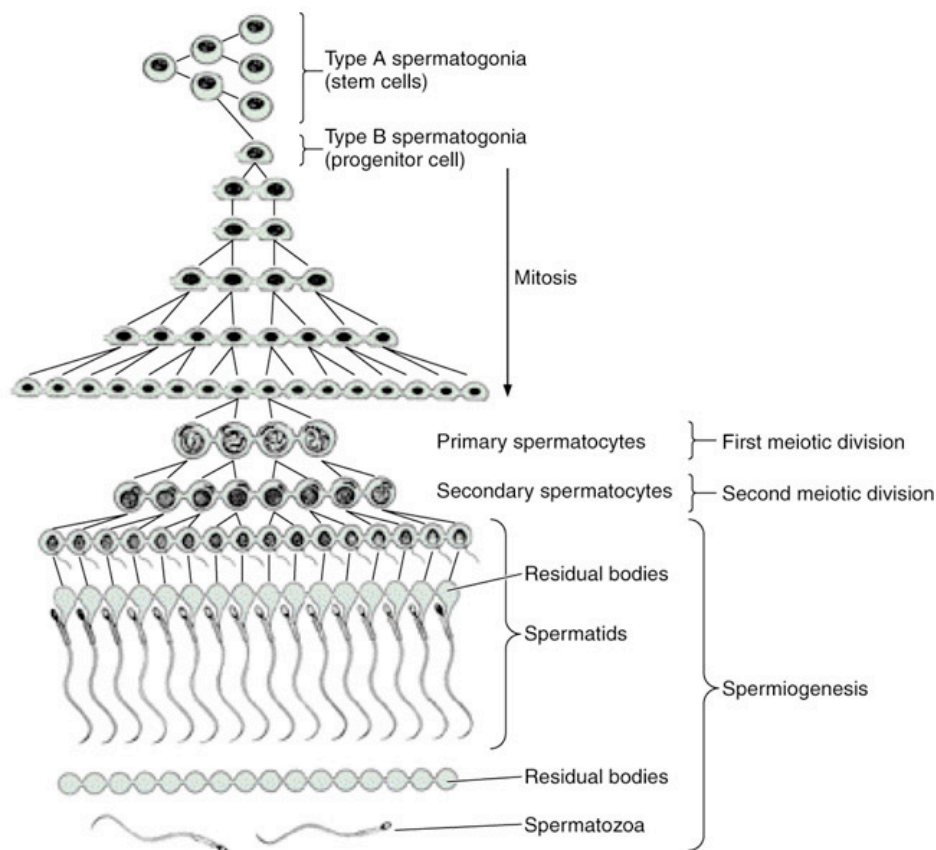


Figura 4. Representación esquemática del proceso de espermatogénesis
Tomada de [2].

Los espermatoцитos primarios en fase de preleptotene replican su ADN y en la fase de zigotene se produce el apareamiento de los cromosomas homólogos, tras el cual entran en paquitene, fase que dura varias semanas. Continúa con una fase breve de diplotene en la que las parejas de cromosomas se separan parcialmente. Tras esto, las células sufren su primera división meiótica para convertirse en espermatoцитos secundarios, que rápidamente pasan por una segunda división meiótica dando lugar a espermátidas redondas haploides [12].

Durante el estado inicial de preleptotene de la meiosis, los espermatoцитos pasan a través de la barrera hematotesticular moviéndose desde la membrana basal hacia el compartimento adluminal [13-14].

Una vez allí, las células germinales continúan diferenciándose en espermatozoides en un microambiente definido y protegido. Sin embargo, ya que la BTB impide que las células germinales en el compartimento adluminal accedan a factores aportados por el sistema circulatorio, las células de Sertoli han de satisfacer las necesidades de las células germinales más maduras [15-16].

- Fase de espermiogénesis: en la cual las espermátidas, que ya no experimentan divisiones celulares, se diferencian en espermatozoides maduros al formar y desarrollar el acrosoma y el flagelo, condensar la cromatina, elongar el núcleo y eliminar el citoplasma [4, 17] (Figura 4).

Los espermatozoides son las células sexuales masculinas. Están formados por una cabeza que consiste principalmente en el núcleo de la célula y tiene su cromatina altamente condensada y el acrosoma, que contiene enzimas importantes para el proceso de fertilización. El cuello es corto y contiene un centriolo y nueve columnas segmentadas de material fibroso que se continúan en la cola y rodean el axonema [2].

1.4. Regulación de la espermatogénesis por andrógenos

La hormona esteroidea testosterona es el principal andrógeno en el testículo que regula la espermatogénesis [3]. Se produce en las células de Leydig en respuesta a la estimulación con hormona luteinizante (LH) y actúa como un factor paracrino que difunde hacia las células de Sertoli. Los efectos de los andrógenos están mediados por el receptor de andrógenos (AR) que es una proteína localizada en el núcleo y citoplasma. La testosterona se une al AR citoplasmático, haciendo que éste se trasloque al núcleo y medie las respuestas funcionales requeridas para soportar la espermatogénesis. En el testículo, la testosterona también interactúa con el AR expresado en las células de Leydig, células mioideas peritubulares, músculo liso de las arteriolas y células endoteliales vasculares [3]. No hay receptores funcionales para andrógenos en células germinales [18].

La testosterona resulta indispensable para cuatro procesos críticos que tienen lugar durante la espermatogénesis:

- Mantenimiento de la BTB: los elevados niveles de AR pueden facilitar el transporte dependiente de testosterona de proteínas de la BTB, ya que en ausencia de AR la expresión de al menos 3 proteínas de unión de la BTB está disminuida [19]. La señalización mediada por testosterona acelera la cinética de internalización de proteínas de la BTB desde la superficie celular e induce la expresión de proteínas que regulan la transcitosis y el reciclado de proteínas [20-21].
- Meiosis: en ausencia de testosterona la espermatogénesis se detiene durante la meiosis, produciendo que tan sólo unas pocas células germinales consigan diferenciarse en espermátidas y no produciéndose espermátidas elongadas [22]. La privación de testosterona altera la expresión y modificación post-transcripcional de 25 proteínas que intervienen en el metabolismo oxidativo, reparación del ADN, procesamiento del ARN, apoptosis y división meiótica [23].
- Adhesión célula de Sertoli-espermátida: en ratas con privación de testosterona, las espermátidas elongadas están ausentes debido a que las espermátidas redondas son separadas de las células de Sertoli de forma prematura [24].

- Liberación de espermatozoides: en ausencia de testosterona, los espermatozoides maduros son retenidos y fagocitados por células de Sertoli [25].

2. Especies reactivas de oxígeno (EROs)

El término especie reactiva de oxígeno abarca varias moléculas derivadas del oxígeno que han aceptado electrones extra y que pueden oxidar otras moléculas [26].

2.1. Producción de especies reactivas de oxígeno

La mayoría de las EROs derivan de la reducción de un solo electrón del oxígeno (O_2) para formar superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Dos moléculas de superóxido pueden convertirse en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y una molécula de H_2O por las superóxido dismutasas (SOD).

El peróxido de hidrógeno también puede aceptar otro electrón del Fe^{2+} liberado en la reacción de Fenton para convertirse en un anión hidroxilo (HO^{\cdot}). Estas tres formas principales de EROs tienen diferentes reactividades que pueden conducir a diferentes efectos en la fisiología celular (Figura 5).

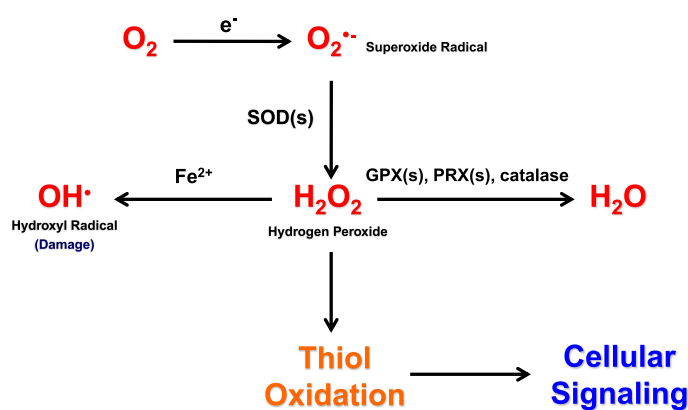


Figura 5. Esquema de la producción de especies reactivas de oxígeno. Tomada de [27].

2.2. Fuentes de especies reactivas de oxígeno

Las EROs se pueden generar exógenamente por tabaco, drogas, xenobióticos, humos o radiación [28], como a nivel endógeno. Las principales fuentes de EROs intracelular son la cadena de transporte de electrones (ETC), el retículo endoplasmático (ER) y el complejo de la NADPH oxidasa (NOX) [29].

A bajas concentraciones, las EROs estimulan la proliferación y aumentan la supervivencia de una amplia variedad de tipos celulares, jugando por tanto un papel esencial como segundos mensajeros [30]. Estudios en los años 90 pusieron de manifiesto que la principal molécula EROs en la señalización es el peróxido de hidrógeno que puede actuar inactivando fosfatasa para facilitar la señal dependiente de factores de crecimiento [31]. El peróxido de hidrógeno tiene capacidad para traspasar membranas. Uno de los mecanismos de señalización del peróxido de hidrógeno es a través de la oxidación de residuos de cisteína en las proteínas [32]. Alternativamente, la oxidación del sitio activo de las cisteínas puede inhibir la actividad y así cambiar las cascadas de señalización, principalmente las dependientes de MAPK y PI3K [33]. Estas cascadas de señalización conducen a la activación de varios factores de transcripción regulados por EROs como AP-1, NF- κ B y p53 [34]. También se ha descrito el papel del superóxido como una molécula de señalización independiente. Además, otras moléculas como el peroxinitrito (ONOO^-) se pueden formar a través de una reacción entre el superóxido y el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$).

Por tanto, las EROs participan de forma fisiológica en procesos de señalización y defensa, incluyendo vasodilatación, apoptosis, angiogénesis, producción de eritropoyetina y destrucción de bacterias y otros patógenos por macrófagos [35]. Pero, las EROs también tienen un papel crucial en la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo aquellas relacionadas con la diferenciación celular como el cáncer debido a pérdida de diferenciación, síndromes de pérdida de masa ósea como consecuencia de la diferenciación de los osteoclastos o la diabetes de tipo 2 debida a la desdiferenciación de células beta [29].

2.3. Sistemas antioxidantes celulares

Como ya se ha mencionado, las EROs se mantienen en niveles fisiológicos mediante un sistema de defensa ya que una producción excesiva o descontrolada de EROs puede producir daño en los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, lo cual está íntimamente asociado con la patogénesis de muchas enfermedades humanas. Esta serie de defensas antioxidantes endógenas pueden ser no enzimáticas, como la vitamina C y E, carotenoides y flavonoides; o bien enzimáticas, como la SOD, catalasa, glutathion peroxidasa (GPx), glutathion S-transferasa y peroxirredoxina (Prx).

Las SOD actúan como primera línea de defensa contra el O_2^- , ya que catalizan su dismutación en H_2O_2 , que es posteriormente convertido en O_2 y H_2O por catalasa, GPx y peroxirredoxinas. Existen 3 isoformas de SOD en función del metal que contienen y su localización: SOD1 (CuZnSOD) que se encuentra en el citoplasma; SOD2 (MnSOD) localizada principalmente en la mitocondria; y SOD3 (CuZnSOD) situada en el espacio intracelular.

2.4. SOD2

De entre las superóxido dismutasas, SOD2 muestra una mayor importancia biológica. Ésto es debido a su localización en la matriz mitocondrial, convirtiendo a este enzima en la primera línea de defensa contra las EROs. Funcionalmente, SOD2 es un homotetrámero de 96 KDa que contiene un átomo de manganeso por subunidad. Éste, se transforma de Mn^{3+} a Mn^{2+} y viceversa durante la dismutación del O_2^- [36]. Se ha demostrado en multitud de organismos el papel fundamental que juega este enzima. Un ejemplo de ello es la inactivación del gen que codifica esta proteína en *Escherichia coli*, que produce aumentos en la frecuencia de mutación cuando se cultiva en condiciones aerobias [37]. La eliminación de este gen en *Saccharomyces cerevisiae* aumenta su sensibilidad al oxígeno [38].

El papel esencial de la SOD2 en el mantenimiento de la función mitocondrial se ha demostrado en estudios con ratones carentes de SOD2, en los que se producía letalidad neonatal así como cardiomiopatías y neurodegeneración que conducían a una muerte postnatal temprana [39-41], cosa que no ocurre en ausencia de otros tipos de SOD, lo que muestra su gran importancia a nivel fisiológico.

En modelos murinos de Alzheimer con una sola copia del gen *Sod2*, se producía una aceleración de la enfermedad, que conllevaba una disminución de la deposición de la proteína β -amiloide en el parénquima y un aumento de ésta en la vasculatura del cerebro [42]. Asimismo, en estudios genómicos de tejido cerebral de accidentes cerebrovasculares (ACV) se identificó *Sod2* como uno de los genes más alterados tras un ACV [43].

Se encontró que ratones heterocigotos para SOD2 mostraban un daño acumulado en el ADN y una subsecuente predisposición al cáncer, pero sin ningún impacto en su esperanza de vida [44]. Pero, en la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT116, una sobreexpresión de SOD2 inducía una detención del crecimiento y un aumento en la senescencia [45].

Estudios previos de nuestro laboratorio han identificado que altos niveles de SOD2 inducen diferenciación neuroendocrina, proceso asociado a peor pronóstico de cáncer de próstata [46-47], así como se ha observado un aumento en pacientes de próstata, colon y pulmón [48].

A horizontal rectangular banner with a dark background. The background is filled with a dense field of small, bright blue, circular and oval shapes, resembling stained cells or microorganisms under a microscope. The word "Objetivos" is centered in white, bold, sans-serif font.

Objetivos

La regulación redox por EROs tiene un papel fundamental en la señalización celular dado que participa en las decisiones de proliferación y diferenciación celular. Se ha demostrado recientemente que SOD2 es una pieza clave en la diferenciación neuroendocrina en la próstata y participa en otros tipos de diferenciación celular. Un complejo e importante proceso de diferenciación es la espermatogénesis, que consiste tanto en la autorenovación de células madre espermatogénicas como en su diferenciación hacia espermatozoides haploides maduros. La señal de diferenciación de este proceso incluye una modulación de los niveles de EROs. De esta forma, la expresión de enzimas antioxidantes como las SOD, que controlan la producción de H_2O_2 , podría tener un papel fisiológico en la espermatogénesis. Por otro lado, se conoce que niveles descontrolados de EROs podrían afectar la producción de espermatozoides.

Por ello, el objetivo general de este trabajo es el estudio de la participación del enzima mitocondrial SOD2 en los mecanismos de diferenciación celular en el testículo a partir de los siguientes objetivos específicos:

1. Validar la sobreexpresión del enzima SOD2 en los individuos SOD2^{+/++}, que portan el transgen que contiene el gen *Sod2* humano.
2. Estudiar las diferencias en el peso relativo del testículo al modificar los niveles sistémicos del enzima SOD2.
3. Comprobar las diferencias en el número de células espermatogénicas tras sobreexpresar los niveles del enzima SOD2.
4. Estudiar la variación en la expresión de AR al modificar los niveles sistémicos del enzima SOD2, analizando su localización en el testículo.
5. Analizar los posibles cambios en la capacidad de fecundación de los ratones en función de los niveles sistémicos del enzima SOD2 que presenten los individuos parentales.

A horizontal rectangular banner with a dark background. The background features a microscopic image of numerous small, blue-stained cells, likely bacteria or yeast, showing various shapes and sizes. The text "Materiales y métodos" is centered in white, bold font.

Materiales y métodos

1. Modelo murino

Para la realización de todos los experimentos se emplearon ratones de la cepa C57BL/6J de la colonia SOD2^{+/+}. Estos ratones sobreexpresan SOD2 ya que portan un transgen conteniendo el gen *Sod2* humano bajo el control transcripcional del promotor de la β -actina humana en heterocigosis [49]. Los ratones fueron amablemente cedidos por la Dra. Robia Pautler del Baylor College of Medicine de Houston (Texas).

1.1. Establecimiento y mantenimiento de la colonia

Una vez recibidos, los animales se mantuvieron en cuarentena en el Bioterio de la Universidad de Oviedo y la Dra. Ana Miar los rederivó mediante cruce con hembras WT superhormonadas. Para ello, se extrajeron los oviductos que contenían los embriones, se lavaron e implantaron en hembras CD1 pseudopreñadas.

Tanto el diseño del experimento como el método de eutanasia de los animales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de Animales de Experimentación del Bioterio de la Universidad de Oviedo. De esta forma, todos los animales usados en el experimento fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂.

1.2. Genotipado

Al cumplir 3 semanas de edad los ratones fueron destetados de la madre, se les colocó un pendiente con un número identificatorio y se les cortó un pequeño fragmento de rabo, a partir del cual se llevó a cabo la extracción de ADN y el posterior genotipado. Para realizar tanto la extracción de ADN como el genotipado se empleó el kit MyTaq™ Extract-PCR Kit (Bioline).

- Extracción de ADN:

En primer lugar, se colocó cada fragmento de rabo en un tubo de 1,5 mL al que se añadieron 35 μ L de H₂O Milli-Q, 10 μ L del buffer A y 5 μ L del buffer B, agitándose en un vórtex. Posteriormente se incubó a 75°C durante 7,5 minutos y se desactivó por calor a 99°C durante 15 minutos.

Luego se centrifugó a 15000 x g durante 1 minuto para que sedimentase el material insoluble y los restos celulares. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, a partir del cual se hizo una dilución 1:10 en H₂O Milli-Q.

- Genotipado:

Para realizar la PCR se usó la siguiente cantidad de cada reactivo por muestra:

- ADN 1:10: 1 µL
- H₂O Milli-Q: 5,5 µL
- Oligonucleótidos sentido y antisentido 20 µM: 0,25 µL
- MyTaq HS Red Mix, 2x: 6,25 µL

Los oligonucleótidos fueron adquiridos a Sigma y su secuencia es la siguiente:

Sentido (F): 5'-CCAGTGTTTGCCTTTTATGG-3'

Antisentido (R): 5'-TCGTAGGGCAGGTCGGGGAG-3'

Para realizar la PCR se llevó a cabo el siguiente protocolo:

Tabla 1. Protocolo de PCR del genotipado de los ratones de la colonia SOD2+/++.

Fase 1	Fase 2			Fase 3
Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación de oligonucleótidos	Elongación	Conservación
95°C / 3 min	95°C / 15 s	63°C / 15 s	72°C / 20 s	12°C / hold
1x	34x			1x

El producto de la PCR se resolvió en un gel al 2% de agarosa (Lonza) a 120V (Figura 6).

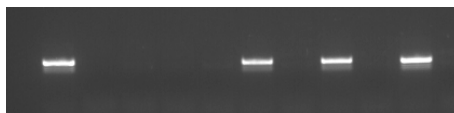


Figura 6. Gel de electroforesis del genotipado de los ratones SUPOX. Las calles en las que aparece una banda son resultados positivos mientras que en las que no hay son resultados negativos.

1.3. Diseño experimental

Para llevar a cabo este estudio se empleó un total de 24 ratones macho de la cepa C57BL/6J, distribuidos de la siguiente manera:

- 12 ratones con genotipo *wild-type* (WT), sacrificados en grupos de 4 a los puntos temporales de 6, 10 y 24 semanas de edad.
- 12 ratones con genotipo SOD2^{+/+} (SUPOX), sacrificados en grupos de 4 a los puntos temporales de 6, 10 y 24 semanas de edad.

De todos ellos se extrajeron ambos testículos. Uno de los testículos de cada animal fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y conservado a -80°C para realizar estudios moleculares, mientras que el otro fue fijado para su uso en estudios morfológicos.

2. Análisis morfológico

2.1. Fijación e inclusión de los tejidos

Los testículos extraídos de los ratones fueron fijados empleando el fijador de Davidson modificado (mDF), compuesto por 30% formaldehído, 15% etanol y 5% ácido acético, en rotación durante 24 horas. Tras este tiempo, se lavaron dos veces con H₂O del grifo y se conservaron en etanol al 70%. La inclusión en parafina del tejido así como los cortes histológicos fueron llevados a cabo en la Unidad de Histopatología Molecular en Modelos Animales de Cáncer del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA).

2.2. Tinciones de rutina

Se realizó una tinción con hematoxilina-eosina y otra tinción con tricrómico de cada uno de los testículos para observar el aspecto y orientación del tejido dentro del bloque de parafina.

2.3. Inmunofluorescencia

Se desparafinaron los tejidos en xilol durante dos periodos de 10 minutos, tras lo cual se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol: etanol 100% 10 minutos, etanol 96% 10 minutos, etanol 70% 10 minutos y, se lavaron durante 5 minutos en agua corriente.

Después, se llevó a cabo un tratamiento para eliminar la autofluorescencia del tejido, que se encuentra principalmente en las células de Leydig. Para ello se lavó en una solución de glicina (Sigma-Aldrich) 0,1 M en PBS (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos. Tras esto, se lavó el tejido en PBS para eliminar la mayor parte de la glicina y se lavó con agua corriente durante 20 minutos. Posteriormente, se procedió con la recaptación antigénica, llevada a cabo con citrato de sodio 10 mM a pH 6,0 durante 20 minutos, empleando para ello un horno microondas.

A continuación se lavó el tejido 5 minutos en TBS y se procedió a su permabilización con una solución 0,1% Triton x-100 (Acros Organics) en TBS durante 10 minutos en agitación y se lavó con agua corriente durante 5 minutos. Se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución 1% de albúmina sérica bovina (BSA) (Santa Cruz) durante 20 minutos, tras lo cual se incubó toda la noche con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti AR (sc-816, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:100 en cámara húmeda a 4°C.

Al día siguiente se lavó tres veces con TBS durante 5 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con ficoeritrina (545(ex)/575(em), Jackson Immunoresearch) a una concentración 1:500 durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se incubó con una dilución 1:10000 de 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich) en TBS filtrado durante 5 minutos en oscuridad. Luego se lavó tres veces con TBS durante 5 minutos.

Finalmente, se colocó un cubreobjetos sobre la muestra, para lo cual se empleó medio de montaje Fluoromount-G (SouthernBiotech), sellando los bordes del cubreobjetos con laca. Los tejidos montados se conservaron a 4°C en oscuridad hasta su uso.

Para realizar el recuento de cada tipo celular: espermatogonias, espermatocitos y células haploides (espermátidas y espermatozoides), se procedió a la tinción de cada uno de los cortes histológicos de testículo con DAPI. Para ello, se llevó a cabo el mismo protocolo que para la inmunofluorescencia pero, sin llevar a cabo recaptación antigénica ni incubación con anticuerpos.

2.4. Microscopía confocal

Se procedió a la visualización de los cortes teñidos con DAPI en un microscopio confocal ultra-espectral Leica TCS-SP2-AOBS de la Unidad de Microscopía Fotónica y Proceso de Imágenes de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. Se tomaron fotos de 10 túbulos diferentes de cada testículo, manteniendo las mismas condiciones entre muestras.

2.5. Recuento celular

Se empleó el programa informático ImageJ con la aplicación Cell Counter para llevar a cabo el recuento de cada estirpe celular. Se contaron las células presentes en 10 túbulos por cada animal.

3. Estudios moleculares

3.1. Extracción y cuantificación de ARN

Se cortó un cuarto del testículo para extraer el ARN, para ello se añadieron 500 μL de TRI Reagent (Sigma-Aldrich) y se homogeneizó la muestra con un Ultra-Turrax[®] (IKA), tras lo cual se dejó reposar la muestra 5 minutos a temperatura ambiente para asegurar una completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. A continuación, se añadieron 100 μL de cloroformo (Merck) y se agitó energéticamente durante 15 segundos, dejando reposar la muestra 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C tras lo que se obtuvieron 3 fases diferentes de las cuales se traspasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL la fase acuosa incolora que contiene el ARN. Se añadieron 250 μL de 2-propanol

(ApplyChem) y se mezcló, dejando reposar la muestra 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó después a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C. Tras esto, el ARN se encontró en forma de precipitado en el fondo del tubo. Se procedió a su lavado retirando el sobrenadante y añadiendo 900 µL de etanol 100%. Se vortexeó y se centrifugó a 12000 x g durante 5 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar parcialmente el precipitado de ARN, se resuspendió en 100 µL de H₂O tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC, Fluka) y se almacenó congelado a -80°C.

A continuación, se procedió a la cuantificación del ARN en un NanoDrop 2000 (Thermo-Fisher Scientific).

3.2. RT-PCR y cuantificación del ADNc

Para llevar a cabo la RT-PCR se empleó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Se añadieron por cada muestra 2 µL de RT Buffer; 2 µL de primers; 0,8 µL de dNTPs y 1 µL de RTasa. Se completó con ARN y H₂O DEPC hasta llegar a un volumen de 20 µL. Se llevó a cabo el siguiente protocolo:

Tabla 2. Protocolo de RT-PCR de las muestras de ARN de testículo.

Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
25°C / 10 min	37°C / 120 min	85°C / 5 min	4°C / 10 min
1x	1x	1x	1x

A continuación, se procedió a la cuantificación del ADNc en un NanoDrop 2000.

3.3. PCR semicuantitativa

Se llevaron a cabo 4 PCRs semicuantitativas, una por cada gen: PGP9.5, Sycp3, Shippo1, marcadores de espermatogonias, espermatocitos y células haploides (espermátidas y espermatozoides), respectivamente; y β-actina como control endógeno. Para ello, se usó por cada muestra 1,6 µL de Mg²⁺; 2 µL de buffer; 2 µL de dNTPs; 1,5 µL de primers y 0,2 µL de Taq polimerasa.

Se usó un volumen de ADNc de tal forma que la concentración final fuese de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y se completó hasta el volumen total de 20 μL con H₂O Milli-Q. Todos los reactivos para llevar a cabo la PCR se adquirieron en Sigma-Aldrich. La secuencia de los oligonucleótidos fue la siguiente:

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos de los genes empleados en la PCR semicuantitativa de cDNA de las muestras de testículo.

Gen	Tamaño (pb)	Secuencia de oligonucleótidos
PGP9.5	168	Sentido (F): 5'-GAGATTAACCCCGAGATGC-3' Antisentido (R): 5'-GAAGTTTTTCATGCTGGGGC-3'
Shippo1	239	Sentido (F): 5'-CCCGGGTGATTACTTTCC-3' Antisentido (R): 5'-GACCTGGAGTCTTGTGC-3'
Sycp3	207	Sentido (F): 5'-CTATCTAATCTTTTTTCGACAACAA-3' Antisentido (R): 5'-CTGCTGAGTTTCCATCATAA-3'
β -actina	154	Sentido (F): 5'-GGTGTATTCCCCTCCATCG-3' Antisentido (R): 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'

Los protocolos utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Tabla 4. Protocolo de PCR semicuantitativa para cada uno de los genes marcadores de estirpes celulares en las muestras de testículo.

Fase 1	Fase 2			Fase 3	Fase 4
Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación de oligonucleótidos	Elongación	Elongación final	Conservación
95°C / 5 min	95°C / 30 s	60°C ó 62°C* / 30 s	72°C / 30 s	72°C / 10 min	20°C / 5 min
1x	35x			1x	1x

*60°C para los genes Sycp3 y Shippo1 y 62°C para los genes PGP9.5 y β -actina.

Los productos de la PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 4,5% a 100V.

Posteriormente, se cuantificaron las bandas correspondientes a cada gen con el software informático Image J.

3.4. PCR cuantitativa

Se llevó a cabo una dilución 1:10 del ADNc previamente cuantificado. Todos los reactivos se adquirieron a Applied Biosystems. Cada muestra de testículo se amplificó por triplicado mediante sondas TaqMan® para evaluar la expresión de AR (Mm00442688_m1) y como control endógeno se empleó la subunidad 18S del ARN ribosómico (Mm03928990_g1). Por cada pocillo se añadieron 5 µL de TaqMan® 2X PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 µL de sonda (AR ó 18S) y 4,5 µL de ADNc diluido 1:10.

La q-PCR se llevó a cabo en un termociclador 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) localizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo.

3.5. Extracción y cuantificación de proteínas

Se cortó un cuarto del testículo y se extrajeron las proteínas usando tampón RIPA que contiene tres detergentes: dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1%, Igepal C al 1% y desoxicolato de sodio al 0,5% en una disolución 50 mM Tris-HCl pH 7,4 con NaCl 150 mM. A ésta se le añadió en fresco ditioneitol (DTT) 1 mM, inhibidores de proteasas (leupeptina 10 µg/mL, aprotinina 2 µg/mL, pepstatina 1 µg/mL y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM) e inhibidores de fosfatasas (ortovanadato de sodio 200 µM y fluoruro de sodio 1 mM). Sobre el trozo de testículo se añadieron 800 µL de RIPA y se homogeneizó la muestra con un Ultra-Turrax® (IKA), tras lo cual se dejó reposar 30 minutos en hielo para asegurar una lisis completa del tejido. Posteriormente, se centrifugó a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C, tras lo cual se obtuvieron 3 fases diferentes: una capa de grasa en la superficie, un precipitado compuesto por restos de membranas y un sobrenadante en el que se encuentran las proteínas. Éste último se transfirió a un tubo eppendorf. Las proteínas se almacenaron congeladas a -80°C hasta su uso.

A continuación, se procedió a cuantificar las proteínas de cada muestra siguiendo el método Bradford [50]. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Cary 50-MPR (Agilent Technologies) a 595 nm y, a partir de ella, se calculó la concentración de proteína en cada muestra.

3.6. Western blot

Se cargaron 35 µg de las proteínas previamente cuantificadas en un gel de acrilamida al 12% (Merck) con una proporción 37,5:1 de 1,5 mm de espesor. Tanto la electroforesis como la transferencia se llevaron a cabo en un equipo Miniprotean3[®] (BioRad). Las membranas PVDF empleadas fueron Immobilon-P (Millipore). Una vez que las proteínas fueron transferidas, se comprobó con la tinción Ponceau-S que había tenido lugar una buena transferencia y se bloquearon durante 1 hora con leche desnatada (Panreac) al 5% disuelta en TBS-T. Posteriormente se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario SOD2 1:6000 (06-984, Millipore) o bien con β-actina 1:6000 (sc69879, Santa Cruz) que se empleó como control endógeno. A continuación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T, tras lo cual se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-rabbit 1:8000 (401315, Calbiochem), en el caso de SOD2, o bien con anti-mouse 1:8000 (sc2060, Santa Cruz), en el caso de β-actina), en leche desnatada al 3% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las membranas tres veces con TBS-T y se procedió a su revelado. Las placas fotográficas se escanearon y la densidad de las bandas se midió con el programa informático Image J.

4. Análisis estadístico

Para comparar los datos entre los ratones de diferente genotipo, se llevó a cabo una prueba t de Student, asumiendo varianzas iguales; mientras que, para comparar los datos entre ratones del mismo genotipo pero de distinta edad, se realizó un test ANOVA de una vía.

A horizontal rectangular banner with a dark background. The background is filled with numerous small, bright blue, circular and irregular shapes, resembling stained cells or microorganisms under a microscope. The word "Bibliografía" is centered in white, bold, sans-serif font.

Bibliografía

1. Schlatt S, Ehmcke J. *Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective*. Semin Cell Dev Biol. 2014. 29: 2-16.
2. Ross MH, Pawlina W. *Histología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 2007.
3. Smith LB, Walker WH. *The regulation of spermatogenesis by androgens*. Semin Cell Dev Biol. 2014. 30: 2-13.
4. Russell ER, Hikim APS, Clegg ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press. 1990.
5. Kaur G, Thompson LA, Dufour, JM. *Sertoli cells - immunological sentinels of spermatogenesis*. Semin Cell Dev Biol. 2014. 30: 30-44.
6. de Rooij DG. *Stem cells in the testis*. Int J Exp Pathol. 1998. 79(2): 67-80.
7. Oatley JM, Brinster RL. *Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals*. Annu Rev Cell Dev Bi. 2008. 24: 263-86.
8. Phillips K, Gassei K, Orwig KE. *Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis*. Philos T Roy Soc B. 2010. 365(1546): 1663-78.
9. Aponte PM, van Bragt MP, de Rooij DG, van Pelt AM. *Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities*. APMIS. 2005. 113(11-12): 727-42.
10. de Rooij DG, Russell LD. *All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask*. J Androl. 2000. 21(6): 776-98.
11. Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. *Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives*. Hum Reprod Update. 2006. 12(3): 275-82.
12. Jan SZ, Hamer G, Repping S, de Rooij DG, van Pelt AMM, Volmer TL. *Molecular control of rodent spermatogenesis*. Biochim Biophys Acta. 2012. 1822(12): 1838-50.
13. Hess RA, Renato de Franca L. *Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium*. Adv Exp Med Biol. 2008. 636: 1-15.
14. Oatley JM, Brinster RL. *The germline stem cell niche unit in mammalian testes*. Physiol Rev. 2012. 92(2): 577-95.
15. Mruk DD, Cheng CY. *Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis*. Endocr Rev. 2004. 25(5): 747-806.
16. Skinner MK. *Sertoli cell secreted regulatory factors*. In: Skinner MK, Griswold, MD (ed.), *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Science; 2005. P. 107-20.
17. Leblond CP, Clermont Y. *Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat*. Ann NY Acad Sci. 1952. 55(4): 548-73.

18. Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C. *Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice*. *Endocr Rev*. 2009. 30(2): 119-32.
19. Meng J, Greenlee AR, Taub CJ, Braun RE. *Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice*. *Biol Reprod*. 2011. 85(2): 254-60.
20. Yan HH, Mruk DD, Wong EW, Lee WM, Cheng CY. *An autocrine axis in the testis that coordinates spermiation and blood-testis barrier restructuring during spermatogenesis*. *P Natl Acad Sci USA*. 2008. 105(26): 8950-55.
21. Su L, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. *Differential effects of testosterone and TGF-beta3 on endocytic vesicle-mediated protein trafficking events at the blood-testis barrier*. *Exp Cell Res*. 2010. 316(17): 2945-60.
22. Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, et al. *Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues*. *P Natl Acad Sci USA*. 2002. 99(21): 13498-503.
23. Stanton PG, Sluka P, Foo CF, Stephens AN, Smith AL, McLachlan RI, et al. *Proteomic changes in rat spermatogenesis in response to in vivo androgen manipulation; impact on meiotic cells*. *PLoS ONE*. 2012. 7(7): e41718.
24. O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI. *Endocrine regulation of spermatogenesis*. In: Neill JD (ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3er ed. Amsterdam: Academic Press; 2006. P. 1017-1069.
25. Holdcraft RW, Braun RE. *Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids*. *Development*. 2004. 131(2): 459-67.
26. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. *Oxygen radicals and human disease*. *Ann Intern Med*. 1987. 107(4): 526-45.
27. Sullivan LB, Chandel NS. *Mitochondrial reactive oxygen species and cancer*. *Cancer Metab*. 2014. 2:17.
28. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. *Redox regulation of cell survival*. *Antioxid Redox Signal*. 2008. 10(8): 1343-74.
29. Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. *Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation*. *Biochim Biophys Acta*. 2014. 1850(8): 1607-21.
30. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. *Nitric oxide: a physiologic messenger*. *Ann Intern Med*. 1994. 120(3): 227-37.

31. Sundaresan M, Yu ZX, Irani K, Finkel T. *Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction.* Science. 1995. 270(5234): 296-99.
32. Finkel T. *From sulfenylation to sulfhydration: what a thiolate needs to tolerate.* Sci Signal. 2012. 5(215): pe10.
33. Finkel T. *Oxidant signals and oxidative stress.* Curr Opin Cell Biol. 2003. 15(2): 247-54.
34. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.* Chem-Biol Interact. 2006. 160(1): 1-40.
35. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* Int J Biochem Cell Biol. 39(1): 44-84.
36. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. *Antioxidant enzymes and human diseases.* Clin Biochem. 1999. 32(8): 595-603.
37. Farr PM, Diffey BL, Humphreys F. *A quantitative study of the effect of terfenadine on cutaneous erythema induced by UVB and UVC radiation.* J Invest Dermatol. 1986. 87(6): 771-74.
38. Van Loon AP, Pesold-Hurt B, Schatz G. *A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen.* P Natl Acad Sci USA. 1986. 83(11): 3820-24.
39. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase.* Nat Genet. 1995. 11(4): 376-81.
40. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu N, et al. *Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice.* P Natl Acad Sci USA. 1996. 93(18): 9782-87.
41. Jang YC, Pérez VI, Lustgarten MS, Salmon AB, Mele J, Qi W, et al. *Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2009. 64(11): 1114-25.
42. Esposito L, Raber J, Kekonoius, L, Yan F, Yu GQ, Bien-Ly N, et al. *Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer's disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice.* J Neurosci. 2006. 26(19): 5167-79.

43. Buga AM, Scholz CJ, Kumar S, Herndon JG, Alexandru D, Cojocaru GR, *et al.* *Identification of the new therapeutic targets by genome-wide analysis of gene expression in the ipsilateral cortex of aged rats after stroke.* PLoS One. 2012. 7(12): e50985.
44. Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe SR, *et al.* *Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging.* Physiol Genomics. 2003. 16(1): 29-37.
45. Behrend L, Mohr A, Dick T, Zwacka RM. *Manganese superoxide dismutase induces p53-dependent senescence in colorectal cancer cells.* Mol Cell Biol. 2005. 25(17): 7758-69.
46. Quirós I, Sáinz RM, Hevia D, García-Suárez O, Astudillo A, Rivas M, Mayo JC. *Upregulation of manganese superoxide dismutase (SOD2) is a common pathway for neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells.* Int J Cancer. 2009. 125(7): 1497-504.
47. Quirós-González I, Sáinz RM, Hevia D, Mayo JC. *MnSOD drives neuroendocrine differentiation, androgen independence, and cell survival in prostate cancer cells.* Free Radic Biol Med. 2011. 50(4): 525-36.
48. Miar A, Hevia D, Muñoz-Cimadevilla H, Astudillo A, Velasco J, Sáinz RM, Mayo JC. *Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer.* Free Radic Biol Med. 2015. 85: 45-55.
49. Ho YS, Vincent R, Dey MS, Slot JW, Crapo JD. *Transgenic models for the study of lung antioxidant defense: enhanced manganese-containing superoxide dismutase activity gives partial protection to B6C3 hybrid mice exposed to hyperoxia.* Am J Resp Cell Mol. 1998. 18(4): 538-47.
50. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem. 1976. 72: 248-54.