

Niveles de expresión de Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) en tejidos con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna

Floriano-Sánchez Esaú,¹ Cárdenas-Rodríguez Noemí,² Castro-Marín Melchor,³ José Luis Reyes Equihua,³ Flores-Terrazas José E,³ Carlos-Vera Arzave,⁴ Torres-Salazar Jesús J.³



■ RESUMEN

Antecedentes: Publicaciones recientes ubican al cáncer de próstata en el tercer lugar de mortalidad en hombres a nivel mundial, en México es la principal causa de muerte masculina y más del 70% se presenta en estadios avanzados. En la actualidad están en estudio varios marcadores genéticos en cáncer de próstata; la Mn-superóxido dismutasa, está asociada con el cáncer pero no existen suficientes estudios al respecto, por ello el objetivo del presente estudio fue evaluar la existencia de alteraciones en los niveles de la Mn-superóxido dismutasa, en cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna.

Material y métodos: Se obtuvieron 80 muestras de las cuales 50% correspondieron a hiperplasia prostática benigna y el resto a cáncer de próstata. Se estandarizó el método diagnóstico por inmunohistoquímica para detectar la presencia de Mn-superóxido dismutasa en los tejidos.

Resultados: El porcentaje de área inmunorreactiva a Mn-superóxido dismutasa fue de $24.83 \pm 10.5\%$ y de $14.73 \pm 8.7\%$ en cáncer de próstata y en hiperplasia prostática benigna, respectivamente.

Conclusiones: Los niveles de expresión de Mn-superóxido dismutasa en cáncer de próstata fueron

■ ABSTRACT

Background: Recent reports place prostate cancer as the third most common cause of death from cancer in the worldwide male population. In Mexico it is the principal cause of death from cancer in men and more than 70% of those cases are in advanced stages. Several genetic markers involved in prostate cancer are currently being studied. Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) is associated with cancer, but there are very few studies in the literature analyzing this relation. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the existence of alterations in Mn-SOD levels in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia.

Materials and methods: Eighty samples, 50% of which corresponded to benign prostatic hyperplasia and 50% to prostate cancer, were obtained. Immunohistochemical diagnostic method was standardized for the detection of Mn-SOD in tissue.

Results: The percentage of Mn-SOD immunoreactive area was $24.83 \pm 10.5\%$ in prostate cancer and $14.73 \pm 8.7\%$ in benign prostatic hyperplasia.

Conclusions: Mn-SOD expression levels in prostate cancer were significantly higher than those in benign prostatic hyperplasia, suggesting that this gene could be

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Escuela Médico Militar, México, D.F. ² Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría, México, D.F. ³ Servicio de Urología, Hospital Central Militar, México, D.F. ⁴ Laboratorio de Estrés Oxidativo, Escuela Superior de Medicina, IPN. Posgrado.

Correspondencia: Dr. Esaú Floriano Sánchez. Escuela Médico Militar. Cerrada de palomas S/N. Col. Lomas de San Isidro. México, D.F. Teléfono: 5540-7728 Extensión 175. Fax: 52 5520-2121. Correo electrónico: floriano_esa@yahoo.com

significativamente mayores que en la hiperplasia prostática benigna, se sugiere que este gen podría ser utilizado como marcador tumoral, en biopsias de pacientes sospechosos de cáncer de próstata.

Palabras clave: cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, Mn-superóxido dismutasa, México.

used as a tumor marker in biopsies in patients suspected of presenting with prostate cancer.

Key words: *Prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, Mn-superoxide dismutase, Mexico.*

■ INTRODUCCIÓN

La próstata es el órgano masculino que con mayor frecuencia cursa con procesos benignos o malignos; la hiperplasia prostática benigna (HPB) es el tumor benigno más común en varones, su incidencia está en relación con la edad. El número de hombres con cáncer de próstata (CaP) se ha incrementado en las últimas dos décadas, como resultado del envejecimiento de la población.¹ En México, el CaP ocupó en el 2000 el segundo lugar de la incidencia de neoplasias en el varón, después del cáncer de piel. Se desconocen las causas específicas que determinan el inicio y la progresión del CaP, sin embargo, se atribuyen factores genéticos y ambientales en la evolución de esta enfermedad; 95% de neoplasias prostáticas malignas corresponden a adenocarcinomas acinares, de estas neoplasias 70% ocurre en la zona periférica.^{2,3}

El sistema de clasificación Gleason, define el grado tumoral con fines pronósticos.¹ El paciente con CaP localizado suele ser asintomático, aunque la exploración rectal digital puede revelar induración, irregularidad y pérdida de la simetría de la glándula. Si el CaP se diagnostica a tiempo, el tratamiento es efectivo reduciendo la morbilidad. El diagnóstico consiste en realizar la exploración rectal digital, obtener el antígeno prostático específico y llevar a cabo ultrasonido transrectal y biopsia para su confirmación.

La prevalencia de la HPB está asociada a la edad e inicia después de los 40 años. En hombres de 60 años de edad, su prevalencia es de 50% y a los 85 años de 90%. Los pacientes con diagnóstico histológico de HPB presentan síntomas del tracto urinario bajo de moderados a severos en el 50%.⁴

La etiología de la HPB es de tipo multifactorial y endocrino. La próstata está compuesta histológicamente por estroma y epitelio, y cada uno, solo o en combinación, puede dar origen a nódulos hiperplásicos y a síntomas característicos.⁵ Los factores asociados al

desarrollo de HPB son los niveles elevados de dehidrotestosterona (DHT) y el envejecimiento. Las observaciones y estudios clínicos en varones, han demostrado el control endocrino para la HPB.

Se sabe que el estrés oxidativo interviene en el desarrollo del CaP. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y las defensas antioxidantes, que puede presentarse por una producción excesiva de las EROS, por disminución de las defensas antioxidantes o combinación de ambas. Dentro de los sistemas antioxidantes enzimáticos, la Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) juega un importante papel en el mantenimiento del balance celular de EROS. Es la encargada de catalizar la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno; debido a que en la respiración mitocondrial se genera un mayor número de superóxido libre en la célula.⁶

Se ha demostrado que existe baja actividad de Mn-SOD asociada a diversos tipos de tumores. La sobreexpresión de Mn-SOD suprime la tumorogenicidad del melanoma humano, células del cáncer de mama y células del glioma, lo que sugiere que Mn-SOD sea un gen supresor del tumor en una variedad amplia de tumores malignos, dando lugar a aplicaciones terapéuticas en un futuro próximo.⁷

La función supresora de la Mn-SOD se ha relacionado con el cáncer de ovario, de mama, de pulmón y de próstata.⁸

Con base en lo anterior, se decidió analizar los niveles de expresión de Mn-SOD en CaP y HPB.

■ MATERIALES Y MÉTODOS

Objeto de estudio: La recolección de las muestras se llevó a cabo de diciembre de 2005 a abril de 2007, se seleccionaron las muestras de los pacientes registrados en la libreta de cirugía del servicio de urología del

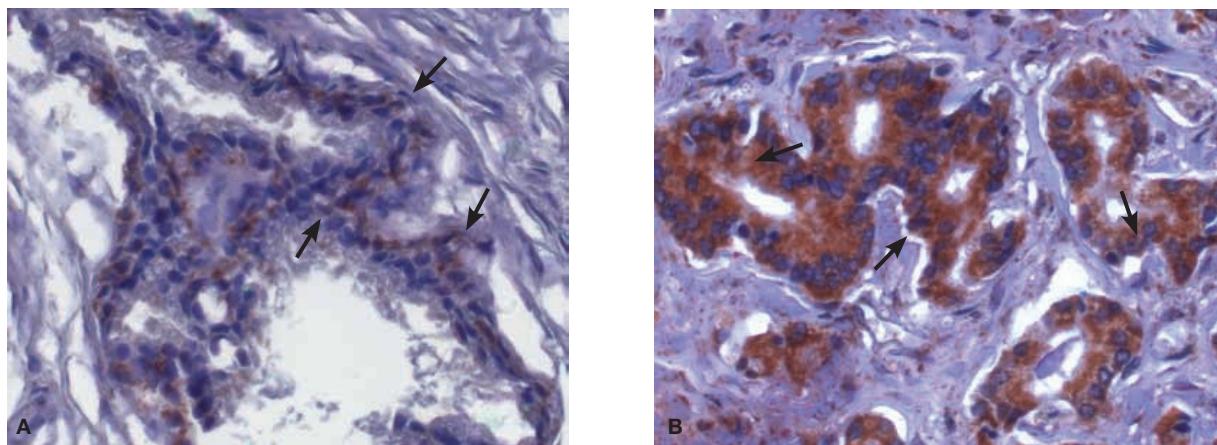


Imagen 1. Se muestra la localización inmunohistoquímica de “MnSOD”, en tejido glandular de hipertrofia prostática benigna (HPB) y de cáncer de próstata (CaP). Las imágenes son cortes histológicos donde se observa la marca de MnSOD, en **A** se observa tejido glandular de HPB, en **B** se observa tejido glandular de cáncer de próstata. Las flechas indican la inmunorreactividad positiva en ambos tipos de tejido. Se observa disminución evidente de la intensidad de la marca en **A**; tanto en forma difusa como densitométricamente ($p = 0.0001$, SEM). Las imágenes son representativas ($n = 40$), (amplificación del campo $\times 400$).

Hospital Central Militar, que cumplieron con los criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Criterios de inclusión: Muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer de próstata con síndrome obstructivo urinario bajo. Muestras de pacientes con diagnóstico de HPB con indicación de resección transuretral prostática (RTUP) y prostatectomía radical.

Criterios de exclusión: Pacientes que no aceptaron participar en el procedimiento. Pacientes que no fueron candidatos a RTUP.

Criterios de eliminación: Tejidos que presentaran focos de CaP e HPB menores a 1 cm^2 . Tejido que en el traslado, sufra desnaturalización del material genético.

La cantidad de tejido necesaria para la investigación fue de 1 hasta 5 g, la obtención de las muestras se hizo inmediatamente después de la realización de la intervención quirúrgica, el tiempo que se determinó como máximo para el traslado fue de una hora; desde la obtención de la muestra hasta su recepción en el laboratorio de biología molecular de la Escuela Médico Militar, donde se mantuvieron a una temperatura de -70°C en el congelador Revco® (Legaci ULT2186 3-35 Dupont SVVA Refrigerants).

Inmunohistoquímica: Por microscopia de luz, las muestras de tejidos de CaP e HPB fueron fijadas por inmersión en formalina ($\text{pH} = 7.4$) y se embebieron en parafina. Para el análisis histológico, se realizaron secciones de tejido (3 m) que fueron teñidas con hematoxilina y

eosina (H&E). Para mostrar la presencia de polisacáridos, mucopolisacáridos y glicoproteínas de la membrana celular, se realizó tinción de secciones de tejido con ácido peryódico de Schiff's (PAS).

Los cortes fueron incubados con ácido peryódico durante 5 min y lavados con agua destilada y con reactivo de Schiff's durante 5 min y contra-teñidos con hematoxilina por 30 segundos. El perfil histológico de 5 campos seleccionados aleatoriamente fueron registrados utilizando el software KS-300 (Carl Zeiss, Jena, Germany). El porcentaje de área dañada con alteraciones histopatológicas fue obtenido (magnificación 400x). Para la inmunohistoquímica las secciones de tejido (3 m) se desparafinaron y se calentaron para desenmascarar los sitios antigenicos; la actividad endógena de la peroxidasa fue bloqueada con 0.03% de H_2O_2 en metanol absoluto. Las secciones de tejido fueron incubadas toda la noche a 4°C , a una dilución 1:200 de anticuerpo monoclonal contra Mn-SOD en solución TRIS. Se removió el anticuerpo primario y se realizaron dos lavados repetitivos con TRIS, los cortes fueron incubados con una dilución 1:500 de anticuerpo polyclonal de conejo como anticuerpo secundario y se realizaron dos lavados repetitivos con TRIS. Los anticuerpos unidos se detectaron con el complejo avidina-biotina (ABC-kit Vectastain) y la diaminobenzidina como sustrato. Después de lavar repetidamente con TRIS los cortes fueron contra-teñidos con hematoxilina. Todos los cortes fueron incubados bajo las mismas condiciones con la misma

concentración de anticuerpo y en la misma corrida, por lo tanto, la inmuno-tinción fue comparable. Todos los especímenes fueron examinados por el microscopio de luz Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, Germany). Para el análisis morfométrico automatizado, el porcentaje de células positivas (color marrón) se determinaron con un analizador de imágenes computarizado KS-300 3.0 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Este equipo detecta automáticamente las células positivas determinando su porcentaje por campo. Cinco campos aleatorios fueron estudiados a una magnificación de 100 (área total 1,584,000 μm^2). Los resultados se expresaron como porcentaje.

Análisis de datos: Los datos de la inmunorreactividad de Mn-SOD fueron analizados con la prueba *t* de Student y los datos se expresaron como media \pm desviación estándar, se compararon ambos grupos (CaP y HPB) y se consideró una $p < 0.05$, como diferencia estadísticamente significativa. Para la aplicación de las pruebas estadísticas se utilizó el programa Graph Prismá versión 3.32.

■ RESULTADOS

Las muestras biológicas se obtuvieron de los 80 pacientes incluidos en el estudio, 40 (50%) con diagnóstico establecido de CaP y 40 (50%) con diagnóstico establecido de HPB.

El porcentaje de área inmunorreactiva a Mn-SOD fue de $24.83 \pm 10.5\%$ en pacientes con cáncer de próstata y de $14.73 \pm 8.7\%$ en pacientes con HPB (**Imagen 1**).

■ DISCUSIÓN

El daño oxidativo causado por EROS y otros radicales libres están implicados en la carcinogénesis prostática. La evidencia de la literatura indica que Mn-SOD funciona como un supresor tumoral, posiblemente por la modulación apoptótica y del crecimiento y proliferación celular. En nuestro estudio encontramos un aumento en esta enzima, en forma significativa, de la misma forma se presentó un incremento en el porcentaje del área marcada del tejido tumoral.

Sin embargo, en varios estudios se ha observado una expresión mayor Mn-SOD en tejido de cáncer en estadios avanzados.⁹

Se sabe que el estrés oxidativo puede contribuir a la carcinogénesis prostática, la enzima primaria antioxidante de la mitocondria, la Mn-SOD, asociándose recientemente a la patogénesis del CaP. Se han realizado estudios que muestran una relación entre el CaP y ciertos polimorfismos, pero la asociación es débil entre este tipo de cambios genéticos y el riesgo del CaP; pero lo evidente es que los antioxidantes endógenos y exógenos desempeñan un papel importante en la prevención clínica del CaP.

La Mn-SOD tiene efectos reguladores sobre el potencial redox de la célula, influye en el crecimiento

celular y en la expresión génica. Nuestros resultados sugieren un aumento en el porcentaje del área marcada en tejido glandular, sugiriendo que la Mn-SOD puede estar sobre-expresándose en forma más difusa en diferentes tejidos, tanto de áreas del estroma como del tejido glandular de CaP.

Además, los resultados del daño de las EROS han sido encontrados solamente en el epitelio y no en el tejido conectivo de CaP.^{10,11}

Otros trabajos previos con diversos tipos de cáncer concuerdan con nuestro estudio, en relación al aumento de los niveles elevados de la enzima Mn-SOD.^{10,11,12,13}

En los tejidos analizados en nuestro estudio, se observó inmunorreactividad en células epiteliales, en tejido conectivo, en células inflamatorias, incluso en células endoteliales. El número de células inmunorreactivas no fue cuantificado, pero es evidente que exhibieron mayor inmunorreactividad en CaP en cuanto a los datos densitométricos.

■ CONCLUSIONES

Los datos densitométricos de la inmunorreactividad de Mn-SOD en tejido glandular de CaP fueron significativamente mayores que los obtenidos en tejido con HPB.

BIBLIOGRAFÍA

1. Prostate cancer risk management: in association with the NHS Cancer Screening Programs; <http://cds.bmjjournals.com/learningcds/index.jsp>.
2. Fleshner N, Trachtenberg J. New developments and controversies in androgen derivation therapy for advanced prostatic carcinoma. AUA Update Series. Lesson;1997.
3. Haas GP, Saks WA. Epidemiology of prostate cancer. CA Cancer J Clin 1997;47(5):273-87.
4. Barry MJ. Epidemiology and Natural History of benign prostatic hyperplasia. R. Urol Clin North Am. 1990;17(3):495-507.
5. Hall SE, Holman CD, Wisniewski ZS, Semmens J. Prostate cancer: socio-economic, geographical and private-health insurance effects on care and survival. BJU Int. 2005;95(1):51-8.
6. St. Clair D, Wan XS, Kuroda M, Vichitbandha S, Tsuchida E, Urano M. Supresion of Tumor Metastasis by Manganese Superoxide-Dismutase is associated with reduced tumorigenicity and elevated fibronectin. Oncol Rev. 1997;4:753-757.
7. Mc Cord JM, Fridovich I. An enzyme base theory of obligate anaerobius: the physiological function of superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci. 1974;71:35-95.
8. Martin RC, Hughes K, Doll MA, Lan Q, Martini BD, Lissowska J, Rothman N, Hein DW. Method for determination of (-102C>T) single nucleotide polymorphism in the human manganese superoxide dismutase promoter. BMC Genet. 2004;14;5(1):33.
9. Li H, Kantoff PW, Giovannucci E, Leitzmann MF, Gaziano JM, Stampfli MJ, Ma J. Manganese Superoxide Dismutase Polymorphism, Pre-diagnostic Antioxidant Status, and Risk of Clinical Significant Prostate Cancer. Cancer Res. 2005;65(6):2498-504.
10. Gonzalo ML, Isaacs WB. Molecular pathways to prostate cancer. J Urol. 2003; 170(6 Pt 1):2444-52
11. Mc Cord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase: an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem. 1969;25:244(22):6049-55.
12. Bostwick DG, Alexander EE, Singh R, Shan A, Qian J, Santella RM, et al. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. Cancer. 2000;89(1):123-34.
13. Hu Y, Rosen DG, Zhou Y, Feng L, Yang G, Liu J, Huang P. Myochondrial Manganese-Superoxide Dismutase expression in ovarian cancer. J Biol Chem. 2005;280(47):39485-92.