

Polimorfismo de la superóxido dismutasa en el infarto cerebral y la aterosclerosis carotídea

Navar Vizcarra Sirelda,* Ortiz López Rocío,* Calvo Anguiano Geovana,* Carrasco Alcántar Diana,* Soto García Anally Jamile,* Barrera-Saldaña Hugo,* Villarreal-Velásquez Héctor Jorge,* Góngora-Rivera Fernando*

* Servicio de Neurología del Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario José Eleuterio González, Monterrey, Nuevo León.

Revista Mexicana de Neurociencia

Marzo-Abril, 2011; 12(2): 82-86

INTRODUCCIÓN

El infarto cerebral (IC) es el inicio repentino de un déficit neurológico focal que dura más de 24 horas como resultado de una isquemia cerebral focal o global.¹

La aterosclerosis conlleva a enfermedad cardíaca isquémica y a infarto cerebral, es una causa importante de morbilidad en la edad adulta. El desarrollo de aterosclerosis depende de factores ambientales y genéticos, el mecanismo exacto o los mecanismos por los cuales los factores genéticos promuevan la formación aterosclerótica todavía se encuentra en investigación.²

La lesión isquémica cerebral desencadena la producción de moléculas de alto potencial oxidativo

derivadas del oxígeno, conocidos como radicales libres de oxígeno (ROS). El sistema nervioso central es particularmente susceptible al daño por los ROS debido a sus altos requerimientos energéticos, gran consumo de oxígeno, alta composición de lípidos polisaturados y niveles relativamente bajos de algunos sistemas antioxidantes.³ El anión superóxido, primer eslabón de la cadena de ROS, aumenta durante la isquemia debido a la disfunción mitocondrial, al aumento del metabolismo del ácido araquidónico y a la catálisis de la enzima xantino-oxidasa.³⁻⁵

La superóxido dismutasa (SOD) es una importante enzima antioxidante citoplásmica que metaboliza radicales superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, proporcionando así una defensa contra toxicidad del oxígeno.⁶

RESUMEN

Antecedentes: El polimorfismo de la superóxido dismutasa (SOD), que es una enzima antioxidante, podría tener un papel importante en el desarrollo de infarto cerebral y aterosclerosis carotídea. **Material y métodos:** Se determinaron los polimorfismos de la SOD (MnSOD y CuZnSOD) en 140 pacientes con infarto cerebral y 140 sujetos sanos. Se incluyeron las variables demográficas utilizando las pruebas de χ^2 , U de Mann-Whitney, o t de Student, según corresponda. Las variables genéticas se incluyeron en un análisis de regresión logística de Cox, pareado por edad, género y etiología, con una $p < 0.05$ como significativa. **Resultados:** De los 140 pacientes con infarto cerebral, 39.3% fueron mujeres y 60.7% hombres. El promedio de edad fue de 63.1 ± 1.37 años. Cuarenta y seis por ciento de los pacientes tenían engrosamiento de la íntima media carotídea (IMT) > 1 mm, 72% placa carotídea (IMT > 1.5 mm) y 33% estenosis carotídea ($> 30\%$). En los casos se encontraron 98.5% homocigotos y 1.5% heterocigotos para CuZnSOD; y para el polimorfismo de la MnSOD 50% fueron homocigotos para alanina, 6.4% homocigotos para valina y 43.5% heterocigotos alanina/valina. No se encontraron diferencias significativas en los controles ($p > 0.05$). No se encontró asociación entre los polimorfismos de la MnSOD y la

Polymorphisms of superoxid dismutase in carotid atherosclerosis and stroke

ABSTRACT

Background: Functional polymorphisms in the genes encoding the superoxide dismutase (SOD), a powerful antioxidant enzyme, may play an important role in the pathogenesis of stroke and atherosclerosis disease. **Methods:** The allele frequencies of two polymorphisms of SOD genes (Mn and CuZn) were investigated in 140 patients with ischemic stroke and compared with 140 controls. We conducted a descriptive analysis of the demographic variables, through analysis of univariate association using χ^2 test, the Mann-Whitney U test and Student's T test, respectively. The genetic variables were included in a Cox regression analysis model paired by age, gender and etiology, with $p < 0.05$ level significance. **Results:** Of the 140 patients with stroke, 39% were women and 61% were men. The average of age was of 63, 1 ± 1.37 years old; 46% carotid intima-media thickness (IMT) > 1 mm, 72% carotid plaque (IMT > 1.5 mm) and 33% carotid stenosis ($> 30\%$). In stroke patients 98.5% were homocigotes and 1.5% heterocigotes for CuZnSOD; and for MnSOD polymorphism 50% were homocigotes for alanine, 6.4% homocigotes for valine and 43.5% heterocigotes

CuZnSOD con la presencia de infarto cerebral ni con el grado de aterosclerosis carotídea. **Conclusiones:** No se encontró asociación entre los polimorfismos de la MnSOD y la CuZnSOD con la presencia de infarto cerebral ni con el grado de aterosclerosis carotídea. Estos resultados deberán ser corroborados por otros estudios en poblaciones diferentes.

Palabras clave: Polimorfismo de la superóxido dismutasa, infarto cerebral, aterosclerosis carotídea.

*alanine/valine. No differences with controls were founded ($p > 0.05$). We found there was no association between the polymorphisms of the MnSOD and the CuZnSOD and the degree of carotid atherosclerosis or stroke. **Conclusions:** Was not associated between the polymorphisms of the MnSOD and the CuZnSOD with the presence of stroke or with carotid atherosclerosis. Further studies are required in different populations in order to establish a conclusion.*

Key words: Polymorphisms of superoxid dismutase, ischemic stroke, carotid atherosclerosis.

Se ha demostrado que la CuZnSOD disminuye el daño cerebral y la formación de edema asociado a la isquemia cerebral focal aguda en modelos de roedores transgénicos.^{4,7}

La mutación del gen de CuZnSOD se ha asociado a otras enfermedades neurodegenerativa como esclerosis lateral amiotrófica,⁸ anormalidades mitocondriales y toxicidad neuronal en condiciones metabólicas de estrés.⁶

Existe un polimorfismo estructural que afecta la secuencia de la enzima MnSOD, esto consiste en el cambio de un nucleótido citosina (C) por timina (T) en la posición 47 del ácido ribonucleico mensajero (C47T), el cual se traduce en un cambio de aminoácido valina (Val) por alanina (Ala) en la posición 16 (Val16Ala) del péptido señal de la enzima. Esta mutación parece afectar la estructura secundaria de la secuencia dirigida a la mitocondria de la SODMn alterando su incorporación a la matriz mitocondrial, lo que causa acumulación de ROS en la célula.⁹ La MnSOD Ala16 se ha asociado cáncer de mama y enfermedad esporádica de la neurona motora, mientras que la MnSOD Val16 se ha ligado a cardiomiopatía idiopática y cáncer pulmón.¹⁰

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron las variables demográficas, antecedentes de riesgo cardiovascular, etiología, y localización del infarto cerebral. Se practicó US Doppler carotídeo en todos los pacientes con infarto cerebral, donde se registró la presencia del espesor íntima media (EIM), engrosamiento del EIM (EIM > 1 mm), presencia de placas carotídea (EIM > 1.5 mm), y estenosis por aterosclerosis (estenosis > 30%) en cualquier segmento de ambas carótidas. Se realizó TAC de cráneo simple o IRM de cerebro y fueron aplicadas las escalas pronósticas de RANKIN y NIH.

Se determinó el polimorfismo de la enzima Cu-ZnSOD y SODMn en 140 pacientes con diagnóstico de infarto cerebral, así como en 140 sujetos sanos.

Prevía autorización del paciente se tomaron 5 mL de sangre periférica coagulada, de la cual se separaron los linfocitos para extraer el ADN que se sometió a reacción en cadena de polimerasa (PCR) y detección del polimorfismo de la enzima Cu-ZnSOD y MnSOD.

Extracción, amplificación y genotipificación

Se realizó la extracción del ADN por el método de TSNT que se sometió a reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar un fragmento (RFLP) y posteriormente se realizó detección del polimorfismo de las enzimas Cu-ZnSOD y SODMn.

El iniciador de CuZnSOD fue P1 5'-CTATCCAGAAAACACGGTAGGGCC-3' y P2 5'-TCTGATATTCAATAAATGCTACAAAAC-3', los cuales generan con la enzima Hha1 un segmento de 278 pares de bases para el alelo principal (A) y un fragmento de 207 pb y 71 pb en presencia del alelo de menor (C) (Figura 1).

Para MnSOD las muestras de ADN se sometieron a la PCR, las condiciones de amplificación fueron:

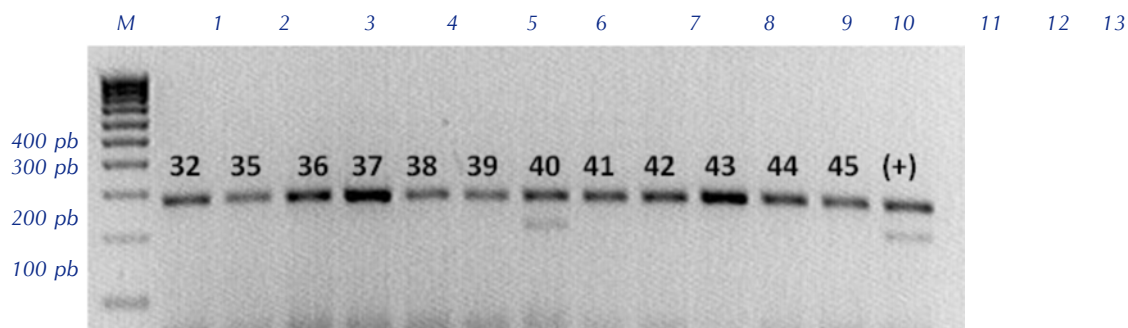
- Desnaturalización inicial a 95 °C/5 minutos.
- 30 ciclos con desnaturalización a 95 °C/30s.
- Alineamiento a 59°/30s y polimerización a 72°/30s.

Los iniciadores fueron:

- P1 5'-CAGCCCAGCCTGCGTAGACGG-3'.
- P2 5'-CTTGGCCAACGCCTCTGGTACTT-3'.

Éstos generan un segmento de 267 pares de bases (pb).

Los productos amplificados se analizaron por el método de polimorfismos de longitud de fragmen-

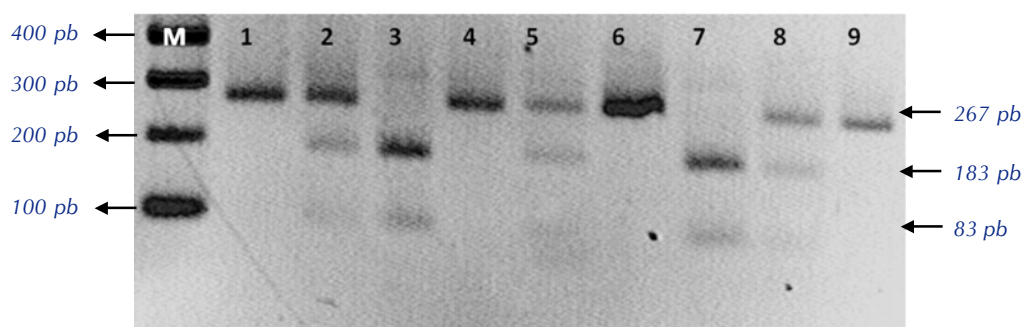


Digestión de productos.-Carril: M marcador de peso molecular de 100 pb, carriles: 32-45 muestras de productos digeridos de pacientes.

Carril 1 al 6 Alelo A
Carril 8 al 12- Alelo A

Carril 7- Alelo C
Carril 13- Control positivo con enzima HhaI

Figura 1. Digestión CuZnSOD + Hha I. Electroforesis en gel de agarosa.



Carril: M marcador de peso molecular de 100 pb
Carril 2, 5 y 8- Heterocigoto Alanina/Valina

Carril 1, 4, 6 y 9- Homocigoto para Alanina
Carril 3 y 7- Homocigoto Valina

Figura 2. Digestión MnSOD + enzima Bsa W I. Electroforesis en gel de agarosa 2%.

tos de restricción (PLFR), generados con la enzima BsaW1, las condiciones de la digestión fue la reacción a 60° de 16- 18 h, los cuales permiten identificar al alelo A (267 pb) y al alelo V (183+84 pb), posteriormente los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con lámpara de luz ultravioleta, lo cual permitió identificar homocigotos para alanina, homocigotos para valina y heterocigotos alanina/valina (Figura 2).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables demográficas y clínicas. Se consideró aterosclerosis carotídea a la presencia de cualquiera de los siguientes criterios:

- Engrosamiento del espesor íntima media.
- Existencia de una placa o estenosis carotídea.

Además se hizo un análisis de asociación univariada con las pruebas de χ^2 , U de Mann-Whitney, o t de Student, para variables no paramétricas dicotómicas o categóricas y variables para métricas, respectivamente con una $p < 0.05$ como valor de significancia estadística, utilizando el software SPSSv15.

RESULTADOS

Se incluyeron 140 pacientes con infarto cerebral ingresados al Servicio de Neurología del Hospital Universitario José Eleuterio González de enero 2009 a julio 2010, 55 (39.3%) fueron mujeres y 85 (60.7%) hombres. El promedio de edad fue de 63.1 ± 1.37

años, con una mínima de 31 años y una máxima de 94 años. Respecto a la etiología del EVC se encontró que la primera causa era secundario a aterosclerosis en 41% seguida de no determinado en 29%.

Las manifestaciones clínicas más frecuentemente encontradas fueron debilidad en miembros superiores en 81% e inferiores 79%, así como parálisis facial 66%. El 55% de los pacientes tenían engrosamiento de la íntima media carotídea (espesor > 1.0 mm), 72% placa (espesor de la pared carotídea > 1.5 mm) y 33% estenosis carotídea (estenosis *in situ* > 30%).

Análisis de polimorfismos de la SOD

Se determinó el polimorfismo de la enzima SODMn y CuZnSOD en 140 pacientes con diagnóstico de infarto cerebral, así como en 140 controles de sujetos sanos (Tablas 1 y 2). Las 140 muestras control se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

No se encontró asociación entre la presencia del alelo A o alelo C de la enzima CuZnSOD (Tabla 1), y del alelo Ala o Val de la MnSOD con el infarto cerebral (Tabla 2). De igual forma, no se encontró asociación entre los polimorfismos de la MnSOD y la CuZnSOD, y la presencia de aterosclerosis carotídea en pacientes con infarto cerebral ($p = 0.905$ para MnSOD, $p = 0.418$ para CuZnSOD), también se realizaron pruebas para valorar si estos polimorfismos se asociaban específicamente con estenosis, placa o engrosamiento de la íntima media, no encontrándose asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

Los polimorfismos de la SOD conllevan a diferentes expresiones de la actividad de la SOD extracelular.¹² Cantidades significativas de radicales libre de oxígeno (oxidantes) se generan durante la isquemia y la reperfusión cerebral, el estrés oxidativo desempeñan un papel importante en daño cerebral después de un infarto cerebral. Además las macromoléculas oxidantes, desencadenan daño celular, están implicados en apoptosis y causan disfunción mitocondrial.⁵ Los datos experimentales en animales de laboratorio transgénicos indican que la sobreexpresión o la deficiencia de las proteínas antioxidantes, principalmente superóxido dismutasa (SOD), han proporcionado evidencia del papel del estrés oxidativo en daño cerebral isquémico.⁵ Naganuma, et al.¹¹ encontraron que el tamaño del infarto cerebral es mayor en el modelo en ratas *knockout* de la expresión de la SOD extracelular.¹³

La MnSOD Ala se ha asociado a algunas enfermedades, como al cáncer de mama, enfermedades de la neurona motora, mientras que la MnSOD Val se ha ligado a cardiomiopatía idiopática y cáncer pulmón.^{10, 14} Sin embargo, no hay estudios que hayan asociado este polimorfismo genético de la SOD con la gravedad de ningún tipo de infarto cerebral.

CONCLUSIONES

No encontramos asociación del polimorfismo de la Cu-ZnSOD y de la MnSOD con aterosclerosis carotídea

Tabla 1
Resultados de los polimorfismos de CuZnSOD

Muestras	ALELO C N (%)	ALELO A N (%)	Total	
Controles	5 (3.6)	135 (96.4)	140	
Casos	2 (1.4)	138 (98.6)	140	$p = 0.447$

Tabla 2
Resultados de los polimorfismos de MnSOD

Muestras	Homocigoto Alanina N (%)	Homocigoto Valina N (%)	Heterocigoto Ala-Val N (%)	Total	
Controles	63 (45)	11 (7.8)	66 (47.2)	140	
Casos	70 (50)	9 (6.4)	61 (43.6)	140	$p = 0.817$

ni con la presencia de infarto cerebral. Estos resultados deberán ser corroborados por otros estudios en poblaciones diferentes.

REFERENCIAS

1. Caplan LR. Intracranial branch atheromatous disease: A neglected, understudied, and underused concept. *Neurology* 1989; 39: 1246.
2. Armstrong Ch, Abilleira S, Sitzer M, Markus HS, Bevan S. Polymorphisms in MMP Family and TIMP Genes and Carotid Artery Intima-Media Thickness. *Stroke* 2007; 38: 2895-9.
3. Knontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: *Stroke* 2001; 32: 2712-16.
4. Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med* 2000; 36: 483-506.
5. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE. Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 2011.
6. Lu Miao and Daret K. St. Clair, Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases *Free Radic Biol Med* 2009; 47(4): 344-56.
7. Lopez F, Hernandez-Palazón. Actividad de la CuZn SOD en un modelo de lesión cerebral isquémica global sin hipotensión arterial, *Neurocirugia* 2004; 15: 151-8.
8. Van Landeghem GF, Tabatabaie P, Beckman G, et al. Manganese-containing superoxide dismutase signal sequence polymorphism associated with sporadic motor neuron disease. *Eur J Neurol* 1999; 6: 639-44.
9. Mitrunen K, Sillanpaa P, Kataja V, et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2001; 22: 827-9.
10. Kinnula VL, Lehtonen S, Koistinen P. Two functional variants of the superoxide dismutase genes in Finnish families with asthma. *Thorax* 2004; 59: 116-19.
11. Naganuma T, Nakayama T, Sato N, Association of extracellular superoxide dismutase gene with cerebral infarction in women: a haplotype-based case-control study 2008; 145(6): 283-92.
12. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, et al. Structural Dimorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence in the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 561-5.
13. Sutton A, Khoury H, Prip-Buss C, et al. The Ala¹⁶Val Genetic Dimorphism Modulates the Import of Human Manganese Superoxide Dismutase Into the Rat Liver Mitochondria. *Pharmacogenetics* 2003; 13(3): 145-57.
14. Wang LI, Miller DP, Sai Y, et al. Manganese superoxide dismutase alanine-to valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1818-21.



Correspondencia: Dr. Fernando Góngora Rivera
 Servicio de Neurología del Departamento de Medicina Interna,
 Hospital Universitario José Eleuterio González
 Av. Francisco I. Madero y Gonzalitos s/n, Col. Mitras, C.P. 64460
 Monterrey, Nuevo León,
 Tel.: 0181 83891111 Ext.: 3233
 Correo electrónico: fernando.gongora@hotmail.com