



# Correlación entre los niveles de expresión de la dismutasa de manganeso-superóxido (Mn-SOD) y el antígeno prostático específico del cáncer de próstata

Floriano-Sánchez E,<sup>1</sup> Cárdenas-Rodríguez N,<sup>2</sup> Castro-Marín M,<sup>3</sup> Flores-Terraza J,<sup>3</sup> Torres-Salazar JJ.<sup>3</sup>



## ■ RESUMEN

Se ha evidenciado que la dismutasa de manganeso-superóxido (MnSOD), además de su función antioxidante, tiene un papel supresor en diversos tumores, entre ellos el de próstata. Ya se ha demostrado que existe una mayor expresión de la dismutasa de Mn-superóxido en tejidos de cáncer de próstata que en la hiperplasia prostática benigna, tanto en estroma como en tejido glandular. Por otro lado, se sabe que las concentraciones del antígeno prostático específico, incluso por debajo de 4.0 ng/mL, son un marcador de riesgo del cáncer de próstata y que sólo 8% de la población sin datos de cáncer presenta niveles superiores. En este estudio se analizan los niveles de expresión de la dismutasa de Mn-superóxido en tejidos con cáncer de próstata y se correlacionan con las concentraciones de antígeno prostático específico.

**Material y métodos:** Se revisaron los expedientes clínicos para la obtención del antígeno prostático específico. La expresión de la dismutasa de Mn-superóxido se determinó por inmunohistoquímica.

**Resultados:** En los 26 tejidos diagnosticados con cáncer no se identificó ninguna correlación entre los niveles de expresión de la (Mn-SOD) y las concentraciones

## ■ ABSTRACT

*In addition to its antioxidant function, manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) plays a role in tumor suppression in different neoplasms, including prostate tumors. Greater Mn-SOD expression in prostate cancer (CaP) tissue than in benign prostate hyperplasia (BPH) tissue in stromal cells as well as glandular tissue has been demonstrated. Prostate specific antigen (PSA), even levels below 4.0 ng/mL, is known to be a CaP risk marker and only 8% of the cancer-free population presents with higher PSA levels. The present study analyzes Mn-SOD expression levels in CaP tissue and correlates them with PSA levels.*

**Materials and methods:** PSA level was retrieved from case records and Mn-SOD expression levels were determined by immunohistochemistry.

**Results:** Of the 26 diagnosed cancer tissue samples, no correlation was found between Mn-SOD expression levels and PSA levels. Data was analyzed using Pearson correlation with an index of 0.04182 and p-value was P=0.4163.

**Conclusions:** There was no correlation between Mn-SOD expression levels and PSA levels in the cancer tissue studied.

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.

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

séricas de antígeno prostático específico, determinado por la prueba de correlación de Pearson, con un índice de 0.04182 y una  $p = 0.4163$ .

**Conclusiones:** No hubo correlación de los niveles de expresión de la dismutasa de Mn-superóxido con respecto a los valores séricos del antígeno prostático específico en los tejidos con cáncer estudiados.

**Palabras clave:** cáncer de próstata, antígeno prostático específico, dismutasa de Mn-superóxido, México.

**Key words:** prostate cancer, prostate specific antigen, Mn-superoxide dismutase, Mexico.



## ■ INTRODUCCIÓN

Se desconocen las causas específicas que determinan el inicio y la progresión del cáncer de próstata (CaP); sin embargo, se han considerado factores genéticos y ambientales en la evolución de esta enfermedad; los individuos con un familiar de primer grado con CaP tienen un riesgo duplicado de desarrollar la neoplasia, mientras que en los casos con dos o tres familiares de primer grado afectados el riesgo aumenta cinco a 11 veces.<sup>1</sup>

El comienzo y la progresión del CaP tienen influencia de los andrógenos.<sup>2</sup> La dieta rica en grasas promueve el crecimiento de líneas celulares del CaP. Las grasas son una fuente de radicales libres que favorecen la aparición del CaP. Existen polimorfismos genéticos vinculados con el riesgo de CaP, como en el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 y la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo 2.<sup>3</sup> El gen del receptor de andrógenos presenta dos polimorfismos que desempeñarían un papel en el inicio y la progresión del CaP. Existe un factor localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q24-25), que incrementa el riesgo de desarrollar esta neoplasia a una edad más temprana.<sup>4,5</sup> Se han reconocido algunos factores protectores relacionados con el CaP: la vitamina D, que es una hormona esteroide que inhibe la proliferación de las líneas celulares del CaP e induce su diferenciación; la vitamina E, un poderoso antioxidante protector de las membranas celulares; las dosis altas de vitamina A; y, en fecha reciente, el licopeno, un carotenoide presente en el tomate.<sup>6</sup>

El CaP es una de las tumoraciones malignas más comunes en el sexo masculino, en cualquier parte del mundo, y ocupa el cuarto lugar de mortalidad.<sup>7</sup> En el año 2004 se diagnosticaron en Estados Unidos cerca de 230,000 cánceres de próstata, 29,900 de los cuales tuvieron un desenlace letal. La paradoja de su tratamiento es que, si bien la enfermedad es aún la segunda causa de muerte por cáncer en los varones, la razón

cercana a 8:1 entre la incidencia de cáncer prostático y la mortalidad específica indica que la gran mayoría de los varones no muere por la enfermedad. Después de los 50 años de edad la incidencia del CaP se eleva tres o cuatro veces cada 10 años más.<sup>2,8</sup> Los afroamericanos muestran la tasa de incidencia más elevada del CaP; la incidencia global de CaP en esta población aumentó de 124 por 100,000 a 250 por 100,000, un incremento de 102%. Los hispanoamericanos registraron una incidencia intermedia de 104 por 100,000. Los países asiáticos, sobre todo Japón y China, tienen una de las tasas más bajas de incidencia y mortalidad por CaP en el mundo.<sup>2,7</sup>

Los índices de sobrevida indican que 92% de los pacientes diagnosticados vive al menos cinco años y 67% cuando menos 10 años. El índice de sobrevida relativo a cinco años cuando el cáncer está localizado es de 100%. El porcentaje de cánceres de próstata que se detectan en estadios iniciales es de 58%. Estas cifras cambian cuando el cáncer se ha propagado pero, si la diseminación es local, el índice de sobrevida a cinco años es de 94%; en esa fase se detecta 31% de estos tumores. La peor expectativa se observa cuando la malformación se descubre tardíamente, lo cual ocurre en 11% de los casos, ya que el índice de sobrevida a cinco años desciende a 31%.

En México, el CaP es la segunda neoplasia más común después del cáncer de piel en los varones y en el 2001 ocupó el primer lugar como causa de muerte por tumores malignos en varones.<sup>7</sup>

En la actualidad existen dos sistemas de estadificación clínica: el sistema TNM (tumor -nódulo-metástasis) ampliamente utilizado en la comunidad europea; y el sistema americano (*Whitmore-Jewitt staging system modified*). La diferencia entre estos dos sistemas radica en que el TNM contiene un mayor número de subdivisiones.

El sistema de estadificación TNM fue propuesto y publicado en 1978 por el AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) y la UICC (*Union Internationale contre le cancer*). Los tres aspectos que valora este sistema son el estadio local del tumor, la afectación de los nódulos linfáticos y la presencia de metástasis.

El sistema de Gleason es el método más utilizado para analizar el grado histológico de diferenciación. Lo propuso el VACURG (*Veterans Administration Co-operative Urological Research Group*). En este sistema, la clasificación se basa en el grado de diferenciación glandular y el patrón de crecimiento tumoral referido al estroma prostático. Este patrón es variable, desde bien diferenciado (grado I) hasta indiferenciado (grado V). Debido a que la mayoría de los carcinomas prostáticos contiene más de un patrón histológico, este sistema también toma en cuenta la heterogeneidad en la disminución de los sistemas de defensa antioxidante, lo que resulta en una mayor concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO).<sup>9</sup>

El estrés oxidativo se considera un estado en el que hay un exceso de ERO, así como una disminución de antioxidantes endógenos.<sup>10,11</sup> En consecuencia, en este estado de estrés oxidativo es en el que se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres. Estos reaccionan con lípidos, proteínas, carbohidratos y el DNA de las células, aunque también con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden infligir un daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular.

El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes se relaciona con la fisiopatología de varias entidades patológicas; en realidad, el propio proceso biológico del envejecimiento se acelera en relación directa con la magnitud del estrés oxidativo.<sup>12</sup>

En fecha reciente se ha establecido que el daño oxidativo desempeña una función esencial en varias anomalías clínicas, entre ellas las enfermedades malignas. Las ERO pueden causar oxidación del DNA y daño a proteínas y genes supresores tumorales y un aumento de la expresión de protooncogenes. El cáncer muestra un cambio prooxidativo en el estado de oxidorreducción.

Las ERO son potenciales carcinógenos ya que facilitan la mutagénesis, además de la promoción y progresión de los tumores; incluso las células normales muestran una incrementada proliferación y expresión de genes relacionados con el crecimiento si se exponen al peróxido de hidrógeno o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).

La mayor parte de las mutaciones inducidas por ERO parece incluir a la guanina, que provoca transversiones G-T; si esto se relaciona con genes críticos, como oncogenes o genes supresores tumorales, puede precipitarse el inicio o la progresión del cáncer.

La hiperplasia prostática crónica se diagnostica en la mayoría de los varones alrededor de los 40 años. Sin embargo, la aparición tardía del carcinoma prostático sugiere que un proceso de múltiples pasos participa en la carcinogénesis: el más probable para la formación endógena de genotoxinas en estas etapas tardías de la vida es la acumulación de ERO.<sup>13</sup>

La dismutasa de superóxido (SOD) forma un conjunto de enzimas que están presentes en casi todas las células; cataliza la reacción de dos aniones  $O_2^{\cdot-}$  para formar peróxido de hidrógeno.

Sólo los microorganismos anaerobios y unas cuantas bacterias aerobias carecen de SOD, ya que su función fisiológica consiste en la eliminación de  $O_2^{\cdot-}$  producido en las reacciones del metabolismo aerobio.<sup>14</sup>

Se conocen tres formas de SOD, según sea el metal utilizado como cofactor. Éstas a su vez pueden dividirse en dos familias filogenéticas diferentes: CuZnSOD y Fe/Mn-SOD.

La dismutasa de manganeso-superóxido (Mn-SOD) pertenece a una familia de metaloproteínas que tiene como función la catalización y remoción de los aniones superóxido tóxicos. La Mn-SOD es un tetrámero de 96 kDa que contiene un ion manganeso y se encuentra en la matriz mitocondrial. Es una enzima inducible por el factor de necrosis tumoral (TNF) que protege a las células de la apoptosis mediada por el TNF<sup>15</sup> a través de la detoxificación  $O_2^{\cdot-}$  y la subsecuente regulación de la apoptosis mediante la liberación de citocromo C y la modulación del estado redox de la mitocondria.<sup>15</sup> La Mn-SOD ha demostrado ser un supresor tumoral en el cáncer de mama.<sup>4</sup> La sobreexpresión de esta enzima protege a las neuronas del NMDA y la toxicidad inducida por el óxido nítrico.<sup>16</sup> Numerosos estudios han indicado que la Mn-SOD juega un papel importante en la prevención de la oxidación celular y la inhibición de la tumorigenicidad.

La Mn-SOD desempeña una función dominante en la protección celular contra daños oxidativos y la concentración celular de regulación del  $O_2^{\cdot-}$ , el cual es extremadamente oxidante y un subproducto indeseable del metabolismo celular. Las alteraciones de los niveles de Mn-SOD se han vinculado con un número de enfermedades neurodegenerativas, incluidos la enfermedad de Parkinson, la distrofia muscular de Duchenne, la enfermedad del Charcot-Marie-Tooth y el síndrome de Kennedy-Alter-Sung.

En muchos tipos de tumores se ha demostrado una actividad baja de la Mn-SOD. La sobreexpresión de ésta suprime el tumorogénico del melanoma humano, células del cáncer de mama y células del glioma, lo que sugiere que la Mn-SOD es un gen supresor del tumor en una amplia diversidad de cánceres. Por ejemplo, St. Clair y otros especialistas divulgaron que la supresión

de la metástasis del tumor por Mn-SOD se relaciona con la reducción de la tumorigenicidad reducida y una elevación de la fibronectina. También encontraron que los tiempos medianos del crecimiento del tumor para las tumoraciones derivadas de todas las células de Mn-SOD transferidas eran mayores que los de las células parentales. También identificaron un aumento de los niveles extracelulares de la fibronectina de la matriz en diversas células de la Mn-SOD transferida. El estrés oxidativo puede inactivar al promotor del gen humano de la fibronectina, que contiene los sitios obligatorios de la proteína SP-1 y los antioxidantes que favorecen la actividad de la transcripción de las proteínas SP-1. Estos investigadores conjeturaron que la expresión de Mn-SOD proporciona un ambiente antioxidante que apoya la actividad de SP-1, lo cual conduce a un nivel creciente de la fibronectina en las células de las Mn-SOD transferidas. La más promisorio función de Mn-SOD se vincula con la inhibición de la tumorigenicidad. Muchos estudios sugieren que la Mn-SOD puede funcionar como un gen general supresor del tumor. Se cree que la Mn-SOD se aplicará a la terapia del cáncer en un futuro próximo.<sup>17</sup>

En relación con otros cánceres, la Mn-SOD actúa de manera supresora, como en los cánceres de ovario, mama, pulmón y, posiblemente, próstata.<sup>18</sup>

El antígeno prostático específico (APE) es una glucoproteína de cadena única (33 kDa). Lo produce y secreta el epitelio prostático y es una de las proteínas más abundantes del plasma seminal, en el que se ha encontrado en concentraciones de 0.2 a 5.0 mg/mL. El rango normal en suero es de 0.1 a 4.0 ng/mL. Además de la glándula prostática, también se ha detectado producción de APE en las glándulas periuretrales. El APE contribuye al proceso de licuefacción del semen a través de la hidrólisis de la proteína semenogelina.<sup>1,19,20</sup>

Aunque el APE es más abundante en el semen, una pequeña proporción se encuentra también en la sangre, en concentraciones normalmente muy bajas: 0 a 4.0 ng por mililitro. El rango normal para el primer examen comercial del APE (el Tandem-R APE creado por Hybritech) en 1986 estaba fundamentado en un estudio en el que se demostró que el 99% de los 472 varones aparentemente sanos tenía un APE total por debajo de 4 ng/mL.<sup>21</sup> El punto de corte de los niveles normales puede aumentar según sea la edad del sujeto. De esta forma, unos niveles de APE séricos de 4 ng/mL pueden considerarse elevados en una persona de 50 años y ser normales en una de 80 años. Los niveles de APE oscilan de forma aleatoria alrededor de 15% en un mismo individuo. En consecuencia, un análisis de APE de 3 ng/mL se puede repetir en otra ocasión y mostrar un resultado de 3.5 o 2.5 ng/mL de forma natural. En un paciente hospitalizado los niveles pueden disminuir hasta 50%. La mayoría de los varones tiene niveles de APE por

debajo de 4 ng/mL de sangre. En la actualidad, el nivel sérico de APE es una prueba muy sensible para detectar en fase temprana el CaP, ya que se eleva en el 65% de los casos.<sup>22</sup>

Cuando se desarrolla CaP, los niveles de APE aumentan por encima de 4. Si los niveles se encuentran entre 4 y 10, la probabilidad de tener un CaP es de 25%. Si las concentraciones del APE son mayores de 10, la posibilidad de padecer CaP es de 67% y aumenta conforme las cifras de APE se incrementan. El APE es un marcador tumoral imperfecto por su falta de especificidad, ya que los niveles del APE pueden verse afectados por muchos factores. La elevación del APE en plasma es proporcional a la masa tumoral presente y, de esta forma, el APE en sangre es una gran prueba para detectar la presencia de CaP. Cuanto más avanzado sea el proceso tumoral, más frecuente será encontrar concentraciones anormales y éstas suelen ser más elevadas. No obstante, un cierto porcentaje de pacientes con CaP tiene cantidades de APE normales, en cuyo caso los resultados son falsos negativos.<sup>23</sup>

El APE está presente en la sangre en dos formas principales. La mayor parte circula en la sangre unida a proteínas plasmáticas y una pequeña cantidad circula sin uniones proteicas, el denominado «APE libre». La prueba del porcentaje de APE libre señala qué cantidad del APE total circula libre en comparación con el que está unido a proteínas. El riesgo de cáncer aumenta si la relación entre APE libre y APE total es menor de 25%. Cuanto menor sea la proporción, mayor será la probabilidad de tener cáncer prostático. Por ejemplo, si el resultado del APE total fluctúa entre 4 y 10 ng/mL (un valor anormal, con un riesgo calculado de 25% de tener un CaP) y al mismo tiempo cursa con un bajo porcentaje del APE total libre menor del 10%, la probabilidad de tener un CaP aumenta a 50% y por ello es necesario realizar una biopsia diagnóstica. Un reciente estudio encontró que si los varones con resultados de APE en el límite superior (4 a 10 ng/mL) se sometían a una biopsia de próstata, ésta se justificaba sólo cuando el porcentaje de APE libre era menor de 25% y que alrededor del 20% de las biopsias de próstata sería innecesario y evitable. Por consiguiente, medir la relación del APE libre del total parece ser de particular interés para eliminar biopsias innecesarias en varones con cifras de APE de 4 a 10.<sup>24,25</sup>

Debido a que el APE es un marcador específico tisular y no tumoral, se ha observado una superposición de los niveles séricos correspondientes a pacientes con hiperplasia prostática benigna y cáncer confinado a un órgano. Entre 38% y 48% de los pacientes con cáncer confinado a un órgano tiene concentraciones séricas de APE dentro del rango normal. Se han encontrado niveles elevados de APE en otras afecciones prostáticas, como prostatitis, hipertrofia be-



nigna e infarto prostático. También se ha observado un aumento de las cifras séricas de APE debido a la manipulación quirúrgica. Esta limitación lleva a replantear la necesidad de profundizar en el estudio molecular de la enfermedad prostática con el fin de perfilar o complementar con nuevos marcadores los métodos diagnósticos utilizados hasta ahora.<sup>26,27</sup>

## ■ MATERIAL Y MÉTODOS

**Sujetos de estudio.** Tejidos correspondientes a pacientes diagnosticados con CaP dentro del periodo comprendido entre 1999 y 2003, almacenados en el Departamento de Patología del Hospital Central Militar, de acuerdo con los criterios de inclusión, exclusión y eliminación. Se revisaron los respectivos expedientes clínicos, así como los libros quirúrgicos del Servicio de Patología para el llenado de la hoja de recolección de datos.

Para la obtención de la muestra, los tejidos con cáncer se solicitaron a la jefatura del Departamento de Patología del Hospital Central Militar de acuerdo con los criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

1. Criterios de inclusión: tejidos de pacientes con diagnóstico histopatológico de CaP obtenidos del almacén del Servicio de Patología registrados entre los años 1999 y 2003.
2. Criterios de exclusión: tejidos de pacientes con diagnóstico de cáncer obtenidos mediante resección quirúrgica, sin existencia de focos de cáncer.
3. Criterios de eliminación: tejidos que en el traslado sufrieran desnaturalización del material genético y tejidos con focos de cáncer menores de 1 cm<sup>2</sup>.

**Inmunohistoquímica.** Las muestras de tejidos de CaP e hiperplasia prostática benigna (HPB) se fijaron por inmersión en formalina (pH = 7.4) y se embebieron en parafina. Para el análisis histológico se tiñeron secciones de tejido (3 mm) con hematoxilina y eosina (H-E). Las secciones de tejido se tiñeron con ácido peryódico de Schiff (PAS) para mostrar los polisacáridos, mucopolisacáridos y glucoproteínas de la membrana celular.

Los cortes se incubaron con ácido peryódico durante cinco minutos y se lavaron con agua destilada. Los cortes se incubaron con el reactivo de Schiff durante cinco minutos y se contratiñeron con hematoxilina por 30 segundos. El perfil histológico de cinco campos seleccionados aleatoriamente se registró mediante el software KS-300 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Se obtuvo el porcentaje de área dañada con alteraciones histopatológicas (magnificación, 400x). Para la inmunohistoquímica se desparafinaron las secciones de tejido (3 mm) y se calentaron para revelar los sitios antigénicos; la actividad endógena de la peroxidasa se bloqueó con 0.03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol absoluto. Las secciones de tejido se incubaron toda la noche a 4°C a una

dilución 1:200 de anti-Mn-SOD en solución TRIS. Se removió el anticuerpo primario y se realizaron dos lavados repetitivos con TRIS; los cortes se incubaron con una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal de conejo como anticuerpo secundario y se realizaron dos lavados repetitivos con TRIS. El anticuerpo unido se detectó con el complejo avidina-biotina (ABC-kit Vectastain) y se empleó diaminobenzidina como sustrato. Después de lavar de forma repetida con TRIS, los cortes se contratiñeron con hematoxilina. Todos los cortes se incubaron bajo las mismas condiciones con la misma concentración de anticuerpo y en la misma corrida y, por lo tanto, la inmunotinción fue comparable. Todas las muestras se examinaron con el microscopio óptico Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, Germany). Para el análisis morfológico automatizado, el porcentaje de células positivas (color marrón) se determinó con un analizador de imágenes computarizado KS-300 3.0 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Este equipo detecta de forma automática las células positivas y determina su porcentaje por campo. Cinco campos aleatorios se estudiaron a una magnificación de 100 (área total, 1,584,000 m<sup>2</sup>). Los resultados se expresaron como porcentaje. Las imágenes se analizaron mediante el software KS300, con la captura de las imágenes: tres por cada estructura (epitelio bronquial y alveolo, en donde se encontró marca).

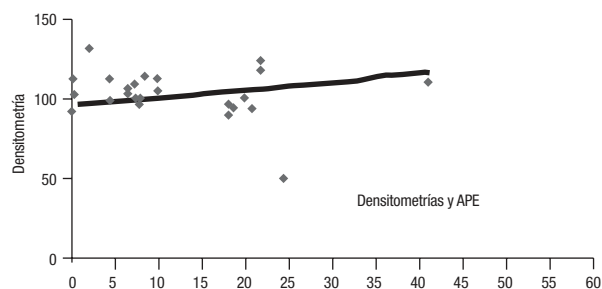
**Análisis estadístico.** La correlación entre la inmunoreactividad de Mn-SOD y los niveles séricos de antígeno prostático específico se analizaron con la prueba de correlación de Pearson y los datos se expresaron tras tomar la media de la desviación estándar y se consideró una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.

## ■ RESULTADOS

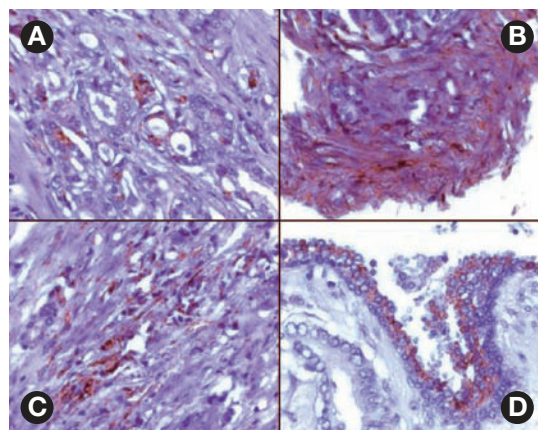
**Datos generales.** En este estudio se consideró a los pacientes registrados en la libreta de intervención quirúrgica en la sala de urología del Hospital Central Militar de acuerdo con los criterios de inclusión.

De los 26 pacientes, todos con diagnóstico clínico e histopatológico establecido de CaP, se obtuvieron las muestras biológicas. La edad de los pacientes con CaP fue de 68.81481, mediana de 69, moda de 74, edad mínima de 55 años y edad máxima de 80 años. El valor de Gleason en el grupo de estudio fue de 4.47, mediana de 5 y valor máximo de 9. El valor del antígeno prostático del grupo de estudio fue de 35.29, mediana de 14.07, valor mínimo de 0.01 y valor máximo de 41.26.

**Correlación de las concentraciones de APE y la inmunoreactividad del tejido con el CaP.** Mediante la prueba de correlación de Pearson no se encontró correlación entre los niveles de expresión de la Mn-SOD y las cifras séricas de APE, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna (**Imagen 1**).



**Imagen 1.** Correlación entre APE y densitometrías. En "y" se registran los valores densitométricos de la inmunorreactividad de la Mn-SOD en tejidos de CaP y en "x" los valores de APE de los pacientes con CaP. La gráfica muestra que los datos de APE tienen una baja correlación con los valores densitométricos de la inmunorreactividad de Mn-SOD en pacientes con CaP.  $N = 26$ ; índice de correlación de Pearson, 0.04182;  $p = 0.4163$ .



**Imagen 2.** Localización de la Mn-SOD por inmunohistoquímica. Imágenes representativas de la expresión de SOD-2 en cortes de tejido humano con diagnóstico histopatológico de CaP. A) APE de 18.8. B) APE de 20.0. C) APE de 20.89. D) APE de 20.91. El tejido glandular de próstata con cáncer, con tinción positiva, muestra un color café. Las microfotografías son representativas ( $N = 3-6$ ) y el campo tiene 40x

**Expresión de la Mn-SOD en los tejidos estudiados.** En los tejidos estudiados, en términos de la inmunorreactividad de Mn-SOD, se observó que los valores densitométricos tuvieron valores en el rango de 90.7901 a 135.8088 y, como ya se ha comentado, no se correlacionan con los valores de APE (**Imágenes 2 y 3**).

Es posible que los datos estudiados en este protocolo puedan aplicarse para valorar en determinados pacientes el grado de agresividad de acuerdo con los valores densitométricos que se determinen en biopsias de pacientes con esta entidad patológica. Por otro lado, los valores obtenidos podrían guiar determinados tratamientos para valorar la evolución terapéutica y tomar biopsias para su análisis.

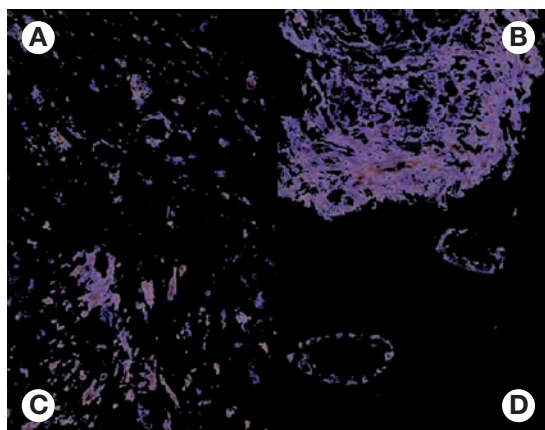
## ■ DISCUSIÓN

El antígeno prostático específico (APE) es una sustancia proteica exclusiva de la próstata y su función es la disolución del coágulo seminal. Los niveles normales en sangre del APE en los varones sanos son muy bajos, del orden de millones de veces menores respecto del semen, y se elevan en diversas enfermedades de la próstata;<sup>28,29</sup> en este estudio se encontró que las concentraciones de APE en los pacientes fueron de 0.01 a 41.26.

Las concentraciones séricas del APE son directamente proporcionales al volumen de la zona transicional, un área histológicamente bien definida que en el CaP se encuentra aumentada en la mayoría de los casos; por consiguiente, de acuerdo con los estudios anteriores (datos no publicados), se observó una sobreexpresión de Mn-SOD en el CaP en comparación con los tejidos

con HPB. En relación con los hallazgos anteriores, los datos hallados en este estudio son consistentes con los ya publicados en la bibliografía, ya que ciertos autores describen un incremento de la expresión de Mn-SOD en algunos tumores<sup>14,30,31</sup> y, por otro lado, los niveles de APE mayores de 4 e incluso inferiores son un marcador de riesgo de CaP. Tohn y colaboradores describieron en 2005 que los niveles de APE de 10 indican riesgo elevado de incidencia de CaP, pero encontraron que la medición de la densidad de APE no es un predictor importante. Por su parte, Thompson y colaboradores señalaron ese mismo año que, a pesar de que la medición del APE ha posibilitado sin duda una mayor detección de cáncer y una migración a fases de menor volumen y tumoración, todavía se desconoce si el tamiz con APE reduce en grado significativo la mortalidad del cáncer de próstata. Además, sugieren que debido a la gran variabilidad existente entre los niveles séricos de APE y el diagnóstico de cáncer, los términos normal y elevado respecto de la medición de APE en cáncer se deben considerar con cuidado, ya que no hay evidencia sólida y consistente dado que 8% de la población puede tener valores mayores de 4 ng/dL.

Por otro lado, en relación con la expresión de Mn-SOD, se menciona en ciertos estudios que esta enzima puede funcionar como un supresor tumoral, posiblemente por la modulación apoptótica, del crecimiento y la proliferación celular.<sup>32</sup> Esta enzima convierte especies reactivas de oxígeno al peróxido de oxígeno e hidrógeno; este último se cataliza en agua por la catalasa y la peroxidasa de glutatión, una enzima dependiente de selenio.<sup>6</sup> La concentración de Mn-SOD se encuentra



**Imagen 3.** Densitometría de la inmunoreactividad de Mn-SOD en CaP. Imágenes representativas ( $N = 3-6$ ; campo a 40x) de la densitometría de la expresión de Mn-SOD en cortes de tejido humano con diagnóstico histopatológico de CaP. A) APE de 18.8. B) APE de 20.0. C) APE de 20.89. D) APE de 20.91. El tejido con CaP muestra inmunoreactividad positiva para Mn-SOD. Las zonas de la microfotografía que son diferentes al color negro indican áreas de inmunoreactividad de la Mn-SOD referida.

incrementada en algunos tumores, como los de ovario, pleura, estómago y esófago,<sup>14,30,31</sup> y como lo señalan estudios anteriores (datos no publicados), hay una sobreexpresión de Mn-SOD en CaP, en comparación con HPB. Los datos de este estudio son consistentes con los descritos anteriormente y los niveles de sobreexpresión de Mn-SOD no se correlacionan con las cifras séricas de APE.

En este protocolo se analizaron 26 tejidos con diagnóstico histopatológico de CaP; la expresión de la Mn-SOD, como se observa en la **Imagen 1**, no se correlaciona con los niveles séricos de APE, pero los datos son consistentes con los descritos en la bibliografía. Kinnula y colaboradores indicaron en 2004 que hay sobreexpresión de Mn-SOD en el mesotelioma de pleura, uno de los tumores humanos más agresivos; Kahlos y colaboradores publicaron en 1998 que la expresión de Mn-SOD en células del mesotelio pleural es baja, comparada con aquella en la que existe enfermedad maligna, en la cual se encuentra aumentada su expresión; por último, Hu y colaboradores describieron en 2005 que en los tejidos con CaP los niveles de Mn-SOD no muestran cambios e incluso están disminuidos<sup>14,30</sup> En el presente protocolo se observó que no existe correlación entre los niveles de Mn-SOD y APE, pero sí se observa que hay una tendencia homogénea hacia la sobreexpresión de esta enzima, como se advierte en la **Imagen 1**, en la cual los valores de Mn-SOD se distribuyen entre 90.7901 y 135.8088 en términos de valores densitométricos.

Hay un gran interés en relación con la función de los radicales libres de oxígeno en la incidencia, progresión

o mortalidad del CaP.<sup>1</sup> En el caso de los estudios anteriores, se reconoció que hay sobreexpresión de Mn-SOD en estos tejidos tumorales (CaP), lo cual puede sugerir que los mecanismos antioxidantes enzimáticos están alterados por una generación excesiva de radicales libres, como ya se describió. Es evidente que los niveles presumiblemente elevados de radicales libres no se correlacionan en general con los niveles de APE (**Imagen 1**).

Gran parte de la investigación que ha demostrado una relación entre las ERO y el CaP ha sido de carácter epidemiológico, sobre todo investigaciones observacionales de cohortes y estudios de casos y controles.

Estudios prospectivos al respecto se encuentran en curso.<sup>28</sup> Los resultados registrados aquí relacionan directamente los niveles de las enzimas antioxidantes y esta entidad patológica, ya que en los diferentes tejidos estudiados se identificó la Mn-SOD sobreexpresada.

La inflamación crónica se ha vinculado con la incidencia de muchos cánceres, incluido el de próstata.<sup>1</sup> Estudios de investigación con muestras de tejidos humanos han demostrado que la proliferación de células epiteliales es el resultado del aumento de la inflamación.<sup>33</sup> Sikka y colaboradores encontraron un incremento del riesgo de cáncer relacionado con mecanismos inflamatorios, dado que el 15% de todos los cánceres puede vincularse con la inflamación crónica.<sup>34</sup> Los estudios epidemiológicos han encontrado un mayor riesgo para el cáncer de próstata en los varones que tienen antecedentes de enfermedades de transmisión sexual o prostatitis.<sup>26</sup> En realidad, la atrofia inflamatoria proliferativa se ha propuesto en fecha reciente como un precursor de la neoplasia intraepitelial prostática y el cáncer de próstata.<sup>25</sup> La inflamación puede dar lugar a la persistencia del estrés oxidativo en las células cancerosas y las especies reactivas del oxígeno pueden representar para ellas una ventaja en la supervivencia.<sup>13</sup>

Los niveles aumentados de estrés oxidativo en el cáncer pueden estimular la proliferación celular y aumentar las tasas de mutación del ADN a través de daños o cambios epigenéticos.<sup>3</sup> Zentella, Saldaña y colaboradores demostraron en sus estudios que la pérdida de enzimas antioxidantes como un suceso temprano en los tumores de próstata establece las bases para la estimulación del crecimiento de ERO.<sup>34</sup> El estrés oxidativo también acentúa la proliferación de las células del cáncer mediante un aumento de la sensibilidad de los receptores del factor de crecimiento y alteración de la actividad del factor de transcripción. Las células inflamatorias, tales como los macrófagos y los mastocitos, liberan factores angiogénicos y citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 1 y factor de crecimiento endotelial vascular, que indican crecimiento y proliferación celular. Además, las citocinas regulan vías de señalización que controlan la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y la metástasis.<sup>34</sup>



Se piensa que el estrés oxidativo es un factor vinculado con muchas enfermedades humanas, ya sea como causa o como efecto. Diversas enfermedades, incluidos cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus, se relacionan con el daño oxidativo mediado en apariencia a través de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno.<sup>12</sup> Los principales componentes celulares sensibles a los daños causados por los radicales libres son los lípidos (peroxidación de los ácidos grasos en las membranas), las proteínas (desnaturalización) y los ácidos nucleicos. El papel de los antioxidantes en la protección contra el estrés oxidativo y el desarrollo o progresión del cáncer es todavía un tema de gran controversia.

La Mn-SOD es una enzima antioxidante que cataliza la conversión de  $O_2^{\cdot-}$  a especies menos reactivas, aunque los estudios sobre su función en el desarrollo o progresión del cáncer son aún controversiales y relativamente pequeños.<sup>17,32</sup> En modelos humanos y murino del cáncer de mama y en los modelos de cáncer de piel, los agentes antioxidantes mostraron una significativa disminución de la incidencia del tumor.<sup>30,31</sup> A pesar de que una gran cantidad de ensayos está disponible para cuantificar el estrés oxidativo y el estado antioxidante, hoy en día no se dispone de métodos para calcular el estrés oxidativo, por lo que la medición es un tanto arbitraria.<sup>35</sup>

Desde un punto de vista práctico, la prevención de la progresión de la enfermedad a un estado metastásico, en el cual el riesgo de mortalidad relacionada con el cáncer se incrementa, también es un resultado deseable. Este objetivo puede alcanzarse no sólo mediante la eliminación de la enfermedad, sino también al detener el crecimiento del tumor. Es todavía controvertido si los niveles de séricos de APE representan un signo clínicamente válido.

En el presente estudio se observó que la Mn-SOD en el tejido glandular no se encuentra disminuida o aumentada respecto de la concentración de APE. Por lo tanto, no existe un incremento de los niveles considerados como normales y la inmunorreactividad de la Mn-SOD no se correlaciona con los niveles séricos del antígeno prostático específico.

Puesto que la etiopatogenia del cáncer de próstata se vincula con el estrés oxidativo<sup>13</sup> y dado que la Mn-SOD es una de las principales enzimas antioxidantes, su incremento en los tejidos con cáncer lleva a presuponer que en estos tejidos con aumento del estrés oxidativo la enzima desempeña una función importante.

La bibliografía muestra discrepancias respecto de la importancia de la Mn-SOD en el cáncer de próstata, ya que su presencia puede significar varios aspectos: un aumento de sus valores normales puede ser el resultado de la compensación del organismo al incrementarse los radicales libres de oxígeno en el tejido estudiado,

o bien este incremento de los radicales libres pueden deberse a la disminución de los sistemas antioxidantes; más aún, ambas cosas pueden suceder en los tejidos. Las futuras investigaciones revelarán la función de las enzimas antioxidantes en el cáncer de próstata, entre ellas la Mn-SOD, aquí estudiada.<sup>20,21,29,36,37</sup>

## ■ CONCLUSIONES

No se identificó una correlación de los niveles de expresión de Mn-SOD en relación con los valores séricos de APE en los tejidos con cáncer estudiados. En términos de la inmunorreactividad de esta enzima, se encontró que los valores densitométricos tuvieron valores que oscilan entre 90.7901 y 135.8088 y, como ya se ha comentado, no se correlacionan con los valores de APE. Es posible que estos datos estudiados puedan aplicarse para valorar en determinados pacientes el grado de agresividad de acuerdo con los valores densitométricos que se determinen en biopsias de pacientes con esta afección patológica. Por otro lado, los valores obtenidos podrían guiar en ciertos tratamientos la valoración de la evolución terapéutica al tomar biopsias para su análisis.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gonzalgo ML, Isaacs WB. Molecular pathways to prostate cancer. *J Urol* 2003 Dec;170(6 Pt 1):2444-52.
2. Fleshner N, Trachtenberg J. New developments and controversies in androgen deprivation therapy for advanced prostatic carcinoma. A.U.A. Update Series. Lesson 12.
3. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 2000 Oct 1;14(19):2410-34.
4. Alcatraz Asencio A. Alteraciones genéticas en el CaP. Instituto de Investigación Básica August Pi Sunyer 2004;5-38.
5. MacDonald NJ, Steeg PS. Molecular basis of tumour metastasis. *Cancer Surv* 1993;16:175-199.
6. Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW. Study of selenium and vitamin E for cancer prevention in patients with carcinoma of prostate. *Nat Can Inst* 2005.
7. Dirección general de vigilancia epidemiológica. Disponible en: [www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx).
8. Harrison's Principios de Medicina Interna. Dennis L Kasper, Eugene Braunwald, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Kurt J. Isselbacher, Ed. Mc Graw-Hill. 2005.
9. Iesaki T, Gupta SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and Bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol* 1999 Sep;277(3 Pt 2):H978-85.
10. Laskin DL, Sunil V, Guo Y, Heck DE, Laskin JD. Increased nitric oxide synthase in the lung after ozone inhalation is associated with activation of NF-kappa. *Environ Health Perspect* 1998 Oct;106 Suppl 5:1175-8.
11. Mögel M, Krüger E, Krug HF, Seidel A. A new coculture-system of bronchial epithelial and endothelial cells as a model for studying ozone effects on airway tissue. *Toxicol Lett* 1998 Aug;96-97:25-32.
12. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987 Oct;107(4):526-45.
13. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 2006 May 11;5:14.
14. Hu Y, Rosen DG, Zhou Y. Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2005 Nov 25;280(47):39485-92.
15. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW. DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res* 2002 May 1;62(9):2695-8.
16. Sarmina Y, Resnick MI. Obstructive uropathy in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1989 Apr;141(4):866-9.



17. St. Clair D, Wan XS, Kuroda M, Vichitbandha ST, Suchida E, Urano M. Supresion of tumor metastasis by manganeso superoxide-dismutase is associated with reduced tumorigenicity and elevated fibronectin. *Oncol Rev* 1997;4:753-757.
18. Martin RC, Hughes K, Doll MA. Method for determination of (-102C>T) single nucleotide polymorphism in the human manganese superoxide dismutase promoter. *BMC Genet* 2004 Dec 14;5(1):33.
19. Roehrbon CG, Mc Connell JD. Etiology, pathophysiology, epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. In: PC Walsh, AB Retik ED, Vaughan Jr, AJ Wein. Vol. 15. Ed. Philadelphia.WB Saunders Co. 2002. 1270 -1330.
20. Mistry K, Cable G. Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *J Am Board Fam Pract* 2003 Mar-Apr;16(2):95-101.
21. Carter HB. Prostate cancers in men with low PSA levels--must we find them? *N Engl J Med* 2004 May 27;350(22):2292-4.
22. Mytrle JF, Klimley PG, Ivor L, Bruni JF. Clinical utility of prostate specific antigen (PSA) in the management of prostate cancer. *Advances in cancer diagnostics*. San Diego: Hybritech Inc, 1986.
23. Mytrle JF. Normal levels of prostate-specific antigen (PSA), clinical aspects of prostate cancer. *Assessment of New Diagnostic and Management Procedures. Proceedings of a workshop of the Prostate Cancer Working Group of the National Cancer Institute's Organ Systems Program*, New York: Elsevier, 183.
24. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 1991 Apr 25;324(17):1156-61.
25. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998 May 20;279(19):1542-7.
26. VanLersel MP, Witjes WP, De la Rosette JJ. Prostate specific antigen density: correlation with histological diagnosis of prostate cancer, benign prostatic hyperplasia and prostatitis.. *Br J Urol* 1995 Jul;76(1):47-53.
27. Crawford E, DeAntoni E, Ross C. The role of prostate-specific antigen in the chemoprevention of prostate cancer. *J Cell Biochemist Suppl* 1996;25:149-155.
28. Yang QF, Sakurai T, Shan L. Novel polymorphisms of prostate-specific antigen (PSA) gene associated with PSA mRNA expression in breast cancer. *J Human Genet* 2000;45(6):363-6.
29. Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL. Evaluation of free serum prostate specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA* 1995 Oct 18;274(15):1214-20.
30. Kahlos K, Anttila S, Asikainen T. Manganese superoxide dismutase in healthy human pleural mesothelium and in malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998 Apr;18(4):570-80.
31. Ryo I, Satoshi A, Motohiro I. Expression of manganese superoxide dismutase in esophageal and gastric cancers. *J Gastroenterol* 1998 Dec;33(6):816-22.
32. Mc Cord JM, Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Nat Acad Sci* 1971;68(5):1024-27.
33. Zhao Q, Simpson LG, Driscoll KE. Chemokine regulation of ozone induced neutrophil and monocyte inflammation. *Am J Physiol* 1998 Jan;274(1 pt 1):L39-46.
34. Zentella M, Saldaña Y. Papel fisiológico de los radicales libres. *Biol Educ Bioq* 1996;15:152-161.
35. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(6):L1005-28.
36. Thon WF, Gadban F, Truss MC. Prostate-specific antigen density--a reliable parameter for the detection of prostate cancer? *World J Urol* 1996;14(1):53-8.
37. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004 May 27; 350(22):2239-46.