

# Marcadores moleculares en cáncer de próstata: Citocromos p450 (CYPs), CYP4F11 y CYP8A1, nuevos citocromos relacionados

Floriano-Sánchez Esaú,<sup>1,2</sup> Castro-Marín Melchor,<sup>3</sup> Cárdenas-Rodríguez Noemí,<sup>4</sup> López-Silvestre Julio Cesar,<sup>3</sup> Zapata-Villalba Miguel Angel,<sup>3</sup> Campos-Salcedo José Gadú,<sup>3</sup> Estrada-Carrasco Carlos Emmanuel,<sup>3</sup> Mendoza-Alvarez Luis Alberto,<sup>3</sup> Rosas-Hernandez Hector,<sup>3</sup> Paredes-Calva Claudio,<sup>3</sup> Reyes-Equihua Jose Luis,<sup>3</sup> Sedano-Lozano Antonio.<sup>3</sup>



## ■ RESUMEN

**Introducción:** El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte en hombres, por cáncer a nivel mundial. Se están estudiando varios citocromos en CaP. Para el caso del CYP4F11 Y 8A1, existen pocos estudios en la literatura. En este estudio, se determinó la presencia del CYP4F11 y 8A1 en CaP e hiperplasia prostática benigna (HPB).

**Material y método:** Se obtuvieron 32 muestras de HPB y 32 de CaP. Se estandarizaron las condiciones, para detectar por inmunohistoquímica la presencia de CYP4F11 y CYP8A1 en los tejidos.

**Resultados:** El CYP4F11 y 8A1 no se expresaron en HPB.

## ■ ABSTRACT

**Introduction:** Prostate cancer is the second cause of death from cancer in men worldwide. Various cytochromes in this disease are being studied, but there are few reports in the literature on cytochromes CYP4F11 and CYP8A1. In the present study, the presence of CYP4F11 and CYP8A1 was investigated in prostate cancer and in benign prostatic hyperplasia.

**Material and method:** Thirty-two hyperplasia and thirty-two cancer samples were obtained and conditions were standardized to detect the presence of CYP4F11 and CYP8A1 in the tissues by means of immunohistochemistry.

**Results:** CYP4F11 and CYP8A1 were expressed in prostate cancer but not in benign prostatic hyperplasia.

1 Sección de Posgrado e Investigación. Escuela Superior de Medicina. Instituto Nacional de Pediatría. México D.F., México.

2 Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Escuela Médico Militar. México D.F., México.

3 Servicio de Urología. Hospital Central Militar. México D.F., México.

4 Laboratorio de Neuroquímica. Instituto Nacional de Pediatría. México D.F., México.

Correspondencia: Dr. Esaú Floriano Sánchez. Sección de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, IPN. Plan de San Luis y Díaz Mirón. Col. Casco de Santo Tomás, Miguel Hidalgo. C.P. 11340. México D.F., México. Celular: 553855 2702. Correo electrónico: floriano\_esa@yahoo.com

**Conclusiones:** Los resultados anteriores sugieren que CYP4F11 y 8A1 podrían ser utilizados como factores pronósticos y/o detección temprana, realizando estudios en biopsias de pacientes sospechosos de CaP.

**Palabras clave:** Cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, CYP4F11, CYP8A1, México.

**Conclusions:** These results suggest that CYP4F11 and CYP8A1 could be used as prognostic and/or early detection factors, by carrying out biopsies in patients suspected of having prostate cancer.

**Keywords:** Prostate cancer, benign prostate hyperplasia, CYP4F11, CYP8A1, Mexico.

## ■ INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte en hombres, por neoplasias a nivel mundial, siendo la primera el cáncer de pulmón.<sup>1</sup> En México, las tres principales causas de muerte por tumores malignos en el año del 2009, correspondieron a próstata (17.1%), tráquea, bronquios y pulmón (16.6%) y estómago (10.4%).<sup>2</sup> La hiperplasia prostática benigna (HPB) es una enfermedad caracterizada por aumento de las células epiteliales y estromales, en el área periuretral de la próstata, que se desarrolla en la zona transicional.<sup>3</sup> 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.<sup>4</sup> El comienzo y la progresión de CaP están influidos por los andrógenos.<sup>5</sup>

El sistema citocromo p450 (CYP450) es una enorme y diversa superfamilia de proteínas, que en el hombre están asociadas a la membrana mitocondrial y del retículo endoplásmico, donde actúan metabolizando cientos de sustancias endógenas y exógenas.<sup>6</sup> Mediante una combinación de investigación de cDNA y amplificación rápida del mismo, se determinó el análisis y secuenciación de una nueva isoforma del citocromo p450 humano, de la subfamilia 4F. La isoforma 4F se designa CYP4F11 y se expresa principalmente en el hígado humano, seguido por el riñón, corazón y músculo esquelético.<sup>7</sup>

Los CYP450 tienen un papel central en el metabolismo oxidante de xenobióticos, incluidos los medicamentos contra el cáncer, los agentes cancerígenos y compuestos endógenos.<sup>8</sup> Varias estrategias terapéuticas están siendo desarrolladas para aprovechar la presencia, la sobreexpresión y la actividad del sistema p450 en tumores.<sup>9</sup>

Por ser el CYP4F11 un citocromo de reciente descubrimiento, los estudios en los que se han empleado son de número reducido, más aún aquellos en los que buscan su presencia en algún tipo de cáncer. Existen a la fecha un par de estudios en los que han buscado la expresión de CYP4F11, en cáncer de colon y ovario.

En el cáncer colorrectal en comparación con el colon normal, la mayor inmunoreactividad fue para CYP2S1 de la tinción inmunohistoquímica. Mientras que CYP1A1, CYP2F1, CYP2R1, CYP4F11, CYP4V2, y CYP4Z1 en más del 80% de los núcleos fueron negativos para estos citocromos.<sup>10</sup>

En el cáncer de ovario no se encontró la expresión proteica de CYP1A1, CYP4F11, CYP24 y CYP39, en comparación con ovario normal.<sup>11</sup>

En cuanto al CYP8A1, la primera ocasión en la que fue reportada la existencia de este citocromo fue en el año de 1994, por Yokoyama y colaboradores mediante un estudio descriptivo del gen humano para la codificación de la prostaciclina sintasa (PGIS). La función de este gen consiste en la síntesis de prostaglandina I2, a partir de prostaglandina H2, jugando un papel en el proceso inflamatorio.<sup>12</sup>

Después en el año 2001, Chevalier y colaboradores reportaron sobre variantes alélicas que afectan la región que codifica para CYP8A1, las cuales causan cambios en los aminoácidos, sin que aún existan análisis sobre estas variantes en el riesgo al cáncer.<sup>13</sup>

De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente estudio fue detectar, por primera vez, la expresión de CYP4F11 y 8A1 en CaP e HPB.

## ■ MATERIAL Y MÉTODO

**Sujetos de estudio:** Se sometieron a estudio 64 tejidos de pacientes registrados en la libreta de intervención quirúrgica, de la Sala de Urología del Hospital Central Militar, dentro del periodo comprendido entre el año 2008 al 2011, de acuerdo con los criterios de inclusión y no inclusión.

**Criterios de inclusión:** 1) Tejido de pacientes con diagnóstico histopatológico de CaP. 2) Tejidos de pacientes con diagnóstico de HPB, analizados en el Departamento de Patología, dentro del periodo comprendido entre el año 2008 al 2011.

*Criterios de no inclusión:* 1) Tejidos de pacientes con diagnóstico de CaP, que hayan sido obtenidos por cualquier otro procedimiento, que no sea prostatectomía radical. 2) Tejidos de pacientes con diagnóstico de HPB obtenidos por biopsia.

#### TIPO DE ESTUDIO:

*Inmunohistoquímica:* Por microscopía de luz, las muestras de tejidos de CaP y HPB fueron fijadas por inmersión en formalina (pH=7.4) y se embebieron en parafina. Para el análisis histológico, secciones de tejido (3  $\mu\text{m}$ ) fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). Las secciones de tejido fueron teñidas con ácido periódico de Schiff's (PAS) para mostrar los polisacáridos, mucopolisacáridos y glicoproteínas de la membrana celular.

Los cortes fueron incubados con ácido peryódico, durante cinco minutos y lavados con agua destilada. Los cortes fueron incubados con el reactivo de Schiff's durante cinco minutos y contrateñidos, con H&E por 30 segundos. El perfil histológico de cinco 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  $\mu\text{m}$ ) se desparafinaron y se calentaron para desenmascarar los sitios antigenicos. La actividad endógena de la peroxidasa fue bloqueada con 0.03% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en metanol absoluto. Las secciones de tejido fueron incubadas toda la noche a 4°C, a una dilución 1:100 de anti-CYP4F11 y a una dilución 1:50, para anti-CYP8A1 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. Despues de lavar repetidamente con TRIS, los cortes fueron contrateñidos con H&E.

Todos los cortes fueron incubados bajo las mismas condiciones, con igual concentración de anticuerpo y en la misma corrida, por lo tanto, la inmunotinción 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  $\mu^2$ ). Los resultados fueron expresados como porcentaje.

## ■ RESULTADOS

Los pacientes con CaP tuvieron un antígeno prostático específico (APE) de 9.62, y una edad promedio de 65.8 años. Los pacientes con HPB tuvieron una APE de 7.91, y una edad promedio de 68.5 años.

De los pacientes con CaP, 6% presentaron un Gleason de puntuación tres, 3% un Gleason de puntuación cuatro, 40% un Gleason con puntuación seis, 36% un Gleason de puntuación siete y 15% un Gleason de ocho.

Respecto a la categoría de las edades, que presentó con mayor frecuencia CaP en este estudio fue de 66-75 años con un 38%, seguido del rango de 56-65 años con 34%.

Se detectó la presencia de CYP4F11 y de CYP8A1, por primera vez en CaP en comparación con tejido hiperplásico, en donde no se observó su presencia (**Figuras 1 y 2**).

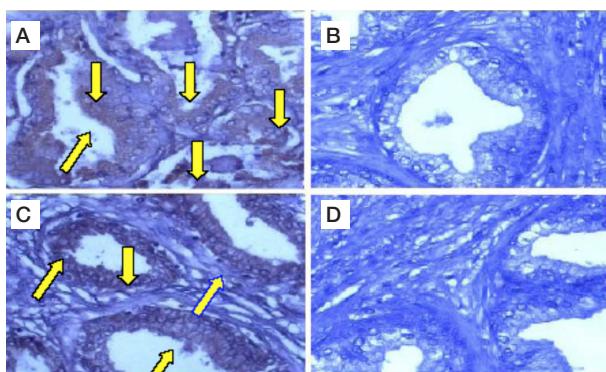
## ■ DISCUSIÓN

Con base en estudios previos es posible observar, que sólo se ha detectado la expresión de los CYP4F11 y 8A1 en algunos tejidos del organismo humano.<sup>11-14</sup> No obstante, en esta investigación se demostró por primera vez la expresión de estos citocromos (CYP4F11, CYP8A1) en CaP. Sobre esto último, podemos sugerir que probablemente tenga un rol en la regulación de los procesos inflamatorios, dado que ya se demostró el papel de TNF- $\alpha$  y la interleucina 1 y el papel de la enzima en el metabolismo de leucotrienos. Por otro lado, dado su papel en la detoxificación de ácidos hidroxiperoxi eicosatetraenoicos (HETES), subproductos de la lipoperoxidación, y que también el factor de transcripción AP-1 está involucrado en la expresión de su gen.<sup>11</sup>

El CYP8A1 (conocido como prostaciclin I2 sintasa) está conformado por 1 500 nucleótidos, que codifican para una proteína de 500 aminoácidos localizada en el cromosoma 20q13.13. Este CYP no posee la típica actividad de monooxigenasa de los otros, ya que cataliza el rearrreglo de prostaglandina H2 (PGH2) a prostaglandina I2 (PGI2). El CYP8A1 posee un residuo de Tyr 430, que es nitrado por peroxinitrito, el cual resulta en la inhibición de la actividad catalítica de este CYP.<sup>15,16</sup>

Este CYP se expresa constitutivamente y puede ser sobreregulado por citocinas, hormonas reproductivas y factores de crecimiento. Además, CYP8A1 puede acoplarse funcionalmente con ciclooxygenas (COX) y fosfolipasas.<sup>17</sup>

Con respecto al papel del CYP8A1 en la carcinogénesis, Frigola y colaboradores en 2005 encontraron una hipermetilación en el promotor de CYP8A1, en cáncer colorrectal.<sup>18</sup> Poole y colaboradores en 2006, encontraron que seis repeticiones polimórficas en los alelos de CYP8A1 (<6R/<6R) se asociaron con un riesgo en el



**Figura 1.** Determinación por inmunohistoquímica de la presencia de CYP4F11 en la glándula y estroma, en CaP y HPB. Glándula de CaP **A).** Glándula de HPB **B).** Estroma de CaP **C)** y Estroma de HPB **D).**

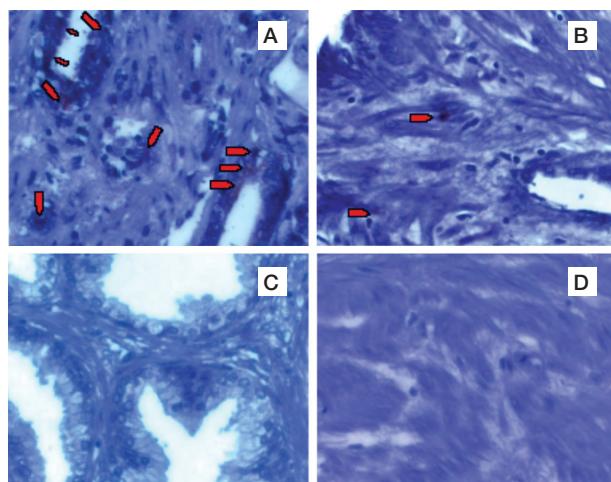
incremento de pólipos colorrectales, en comparación con el genotipo silvestre (6R/6R).<sup>19</sup>

Stearman y colaboradores en 2007, y Nemenorff y colaboradores en 2008, mencionan la importancia de la vía del ácido araquidónico en cáncer de colon y pulmón, así como en otras enfermedades inflamatorias. En el caso de las neoplasias de pulmón, se observa que este CYP (8A1) se encuentra regulado en forma específica. En ratones transgénicos con sobreexpresión de CYP8A1 se ha visto una protección contra carcinógenos del humo de tabaco, que inducen la formación tumoral en pulmón, por lo que tendría un papel en la quimioprevención.<sup>20,21</sup>

Por otro lado, Kajita y colaboradores en 2005 analizaron la expresión del ARNm de COX-2, tromboxano A2 (TXA2) y CYP8A1 por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, en carcinoma papilar tiroideo y en tejidos normales. En este estudio se incrementó de manera significativa TXA2, no hubo diferencias en COX-2 y de manera importante se incrementó CYP8A1.<sup>22</sup>

En nuestro estudio, al analizar la presencia por inmunohistoquímica de CYP8A1 y 4F11 en tejidos con CaP, encontramos la presencia de estas proteínas, así como su ausencia en tejidos con HPB. Los resultados sugieren que los porcentajes de área marcada para este CYP fueron más elevados y frecuentes, conforme aumenta la edad, Gleason y APE.

De acuerdo con las evidencias anteriores, probablemente CYP4F11 y CYP8A1 tengan un papel regulatorio en el estrés oxidante durante la transformación de las células normales a cancerosas en la próstata, sobre todo porque este último está involucrado en la vía inflamatoria.



**Figura 2.** Determinación por inmunohistoquímica de la presencia de CYP8A1 en la glándula y estroma, en CaP y HPB. Glándula de CaP **A).** Estroma de CaP **B).** Glándula de HPB **C)** y estroma de HPB **D).**

## ■ CONCLUSIONES

En este estudio demostramos que el CYP4F11 y 8A1, se expresan en tejidos con CaP y no en tejidos con HPB. Este hallazgo nos podría indicar que las células tumorales en el CaP, se encuentran reguladas en cierta parte por el metabolismo endógeno y de xenobióticos, así como por el estrés oxidante, dado la participación del sistema CYP450 en estos fenómenos.

Lo anterior puede generar cambios genéticos continuos, que se manifiestan como un aumento en las anomalías cromosómicas y en las mutaciones, lo que a su vez puede propiciar la génesis y propagación tumoral. Con los resultados obtenidos se podría sugerir, que el CYP4F11 y 8A1 pueden ser empleados como marcadores de detección temprana y/o seguimiento o como factores pronósticos en pacientes con CaP. Sin embargo están justificados estudios posteriores que aclaren el papel de la quimioprevención de estos citocromos, para alargar la aparición clínica del CaP a lo largo de la vida del paciente, o bien para que sean utilizados como verdaderos factores pronósticos.

## ■ AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos de CONACYT ( proyecto: SALUD- 2010-01-140535, del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social) y por el IPN (SAPPI, Proyecto SIP: 20113894). LAOA beca No.241493 y CRB beca No.265693 por el CONACYT. PIFI (IPN) No. 3387, 3391 y 3357; CAVJ, SAPM y JJMH. Se le Agradece

a la Fundación Gonzalo Río Arronte IAP, México, por la donación del Microscopio Confocal Axiovert 200 M.

## REFERENCIAS

1. Sona EH, D'Arcy JC, Holman Z, et al. Prostate cancer: socio-economic, geographical and private-health insurance effects on care and survival. *BJU Int* 2005;95:51-58.
2. Sociedad Mexicana de Cirugía. Guías clínicas en México, emisión de la Academia Mexicana de Cirugía. Sánchez González Jorge Manuel, Tena Tamayo Carlos, Díaz González Norma Juárez, Vargas Domínguez Armando, Rivera Cisneros Antonio Eugenio, Lozano Alcázar Jaime. *Cir Ciruj* 2004; 72(1):63-68.
3. Guess H. Benign prostatic Hyperplasia: antecedents and natural history. *Epidemiol Rev* 1992;14:131-153.
4. Ahmed M, Lee CT, Oesterling JE. Current trend in the epidemiology of prostatic disease: benign hyperplasia and adenocarcinoma. Boca Raton, Florida. CRC Press, 1997;589-599.
5. Fleshner N, Trachtenberg J. New developments and controversies in androgen derivation therapy for advanced prostatic carcinoma. A.U.A. Update Series 2009;03:278-279.
6. Danielson P. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* 2002;3:561-597.
7. Wang Y, Bell JC. Gene regulation of CYP4F11 in human keratinocyte HaCaT cells. *Drug Metab Dispos* 2010;38:100-107.
8. Murray GI. The rôle of cytochrome p450 in tumour development and progression and its potential in therapy. *J Pathol* 2000;192:419-426.
9. Chun YJ, Kim S. Inhibitors as new promising anti-cancer agents: future therapeutic directions. *Med Res Rev* 2003;23:657-668.
10. Gonzalez ZM, Ensz LM, Mukhina G, et al. Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 1998;18:2040-2055.
11. Kikuta Y, Kusunose E. A novel form of cytochrome P-450 family 4 in human polymorphonuclear leukocytes. cDNA cloning and expression of leukotriene B<sub>4</sub> omega-hydroxylase. *J Biol Chem* 1993;268:9376-9380.
12. Yokoyama C, Yabuki T, Inoue H. Human gene encoding prostacyclin synthase (PTGIS): genomic organization, chromosomal localization, and promoter activity. *Genomics* 1996;36:296-304.
13. Agundez JA. Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab* 2004;5:211-224.
14. Diane DM, David EP. Profiling Cytochrome p450 Expression in Ovarian Cancer: Identification of Prognostic Markers. *Clin Cancer Res* 2005;11:7369-7375.
15. Wu KK, Liou JY. Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:45-52.
16. Pradono P, Tazawa R, Maemondo M. Gene transfer of thromboxane A (2) synthase and prostaglandin I (2) synthase antithetically altered tumor angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 2002;62:63-66.
17. Wade ML, Fitzpatrick FA. Nitric oxide modulates the activity of the hemoproteins prostaglandin I<sub>2</sub> synthase and thromboxane A<sub>2</sub> synthase. *Arch Biochem Biophys* 1997;347:174-180.
18. Frigola J, Muñoz M, Clark SJ, et al. Hypermethylation of the prostacyclin synthase (PTGIS) promoter is a frequent event in colorectal cancer and associated with aneuploidy. *Oncogene* 2005;24:7320-7326.
19. Poole EM, Bigler J, Whifton J. Prostacyclin synthase and arachidonate 5-Lipoxygenase polymorphisms and risk of colorectal polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:502-508.
20. Stearman RS, Grady MC, Nana-Sinkam P, et al. Genetic and epigenetic regulation of the human prostacyclin synthase promoter in lung cancer cell lines. *Mol Cancer Res* 2007;5:295-308.
21. Nemenoff R, Meyer AM, Hudish TM, et al. Prostacyclin prevents murine lung cancer independent of the membrane receptor by activation of peroxisomal proliferator activated receptor gamma. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008;1 (5):349-356.
22. Kajita S, Ruebel KH, Casey MB, et al. Role of COX-2, thromboxane A<sub>2</sub> synthase, and prostaglandin I<sub>2</sub> synthase in papillary thyroid carcinoma growth. *Mod Pathol* 2005;18:221-227.