

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Maiquideli Dal Berto

**O EFEITO DO ÂNION SUPERÓXIDO
E DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
NO DESEQUILÍBRIO DO CÂNCER DE
PRÓSTATA: UMA ANÁLISE *IN VIVO*
E *IN VITRO***

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2016**

Maiquideli Dal Berto

**O EFEITO DO ÂNION SUPERÓXIDO
E DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
NO DESEQUILÍBRIO DO CÂNCER DE
PRÓSTATA: UMA ANÁLISE *IN VIVO*
E *IN VITRO***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dra. Claudia Giuliano Bica
Co-orientador: Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

**Porto Alegre
2016**

Catálogo na Publicação

Dal Berto, Maiquidieli

O efeito do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio no desequilíbrio do câncer de próstata: uma análise in vivo e in vitro / Maiquidieli Dal Berto. -- 2016.

54 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2016.

Orientador(a): Profa. Dra. Claudia Giuliano Bica ;
coorientador(a): Profa. Dra. Ivana Betrice Mânica da Cruz.

1. Câncer de Próstata . 2. Estresse Oxidativo. 3.
Superoxido Dismutase. 4. Polimorfismo Ala16ValSOD2. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista, com todo o meu amor, a minha família em especial meus pais Irineu e Vera e a minha irmã Maiqueli, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **DEUS**, pela presença constante em minha vida.

A minha querida **Professora Dra. Claudia Bica**, por ter me aceito como orientanda. Obrigada por ter me recebido com tanto amor e carinho. Grata pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência, comprometimento, atenção e dedicação durante minha trajetória. Admiro como profissional e como pessoa, tens um coração enorme. Muito obrigada!

A minha querida **Professora Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz** (co-orientadora), que se fez presente em todo meu trabalho. Além disso, gostaria de agradecer por ter acreditado no meu potencial, por não ter medido esforços em momento algum para me ajudar. Levo comigo uma admiração enorme. Obrigada por tudo.

Aos meus amados pais **Irineu Dal Berto e Vera Dal Berto**, por todo amor transmitido. Obrigada pelo apoio moral e financeiro, pelo incentivo, pela educação e pelo carinho. Por sempre acreditarem nos meus sonhos e não medirem esforços para que eles acontecessem. Obrigada pelos momentos felizes e também pelos momentos compartilhados de angústia e medo, mas que sempre estiveram ao meu lado me dando força e coragem para seguir. Sou e serei eternamente grata por tudo. Amo vocês.

A minha amada irmã **Maiqueli Dal Berto**, por estar sempre ao meu lado. Muito obrigada pelo amor doado, pela amizade incondicional, pelas brigas, incentivo e apoio durante a minha trajetória. Com certeza você foi o melhor presente. Te admiro, te respeito, te cuido e te amarei para sempre.

Aos meus **Familiares**, que mesmo distantes, compartilhamos momentos alegres, de carinho, de conhecimento e conversas de apoio e incentivo.

Ao pessoal do **Biogenômica**, por toda dedicação e comprometimento. Obrigada de todo meu coração por cada um que me ajudou na execução do meu trabalho, sem vocês, nada teria acontecido. Grata também pelo acolhimento, que sempre foi de muito carinho e respeito.

Ao pessoal que me acolheu em suas residências enquanto fazia os experimentos em Santa Maria, **Fernanda Babisan, Gabriela Richter, Julia Richter, Nathalia Faistel, Ricardo Gonçalves, Sueme Barreto e Verônica Azzolin**. Grata pela atenção e carinho pela qual sempre fui recebida. Obrigada também, pela amizade, que mesmo longe estão sempre presentes. E em especial a **Fernanda Barbisan e Verônica Azzolin** que me ajudaram do início ao fim nos experimentos.

A minha querida amiga **Deise Nascimento de Freitas**, que se faz presente desde minha graduação. Muito obrigada pela amizade.

Aos meus queridos amigos **Candida Grassi, Evandro Xavier e Jaqueline Piccolo** que mesmo distantes estão sempre comigo.

As minhas queridas colegas **Aniúscia Vieira Dos Santos, Francine Rahmeier, Giovana Tavares e Taiana Haag**, presentes durante a minha jornada. Obrigada pelo companheirismo, confidências, momentos de descontração e incentivo. Se tornaram pessoas especiais de grande respeito e admiração.

Findando, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer de Próstata	1
1.1.1. Epidemiologia	1
1.1.2. Fatores de Risco	2
1.1.3. Sintomatologia	3
1.1.4. Diagnóstico	4
1.1.5. Tratamento.....	8
1.2. Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo.....	10
1.3. Defesas antioxidantes.....	12
1.4. Superóxido Dismutase (SOD)	12
1.5. Polimorfismo da SOD2	14
1.6. Polimorfismos da SOD2 e o Câncer de Próstata	18
1.7. Miméticos do polimorfismo da SOD2.....	20
1.8. Referências bibliográficas.....	22
2. OBJETIVO	31
2.1. Objetivo Geral.....	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	32
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
5. ANEXO	34
5.1. Artigo publicado na revista Medical Oncology	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC- American Joint Committee on Cancer

Ala16Val da SOD2- Polimorfismo da superóxido dismutase dependente de manganês

Ala/Val

AR- Receptores de andrógenos

ATP- Adenosina tri-fosfato

CAT- Catalase

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EROs- Espécies Reativas de Oxigênio

GPx- Glutathione Peroxidase

GSH- Glutathione Reduzida

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

INCA- Instituto Nacional do Câncer

LOO[•] - Radical Peroxila

LHRH- Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante

SOD2 - Superóxido Dismutase Dependente de Manganês

MTS- *Mitochondrial target sequence*

NADPH- Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

O₂ – Oxigênio

O₂^{•-} - Superóxido

PSA- Antígeno Específico da Próstata

RL- Radicais Livres

RNA- Ácido Ribonucleico

SOD- Superóxido Dismutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo enzimático antioxidante.....	13
Figura 2. Superóxido dismutase.....	14
Figura 3. Desenho esquemático da formação do SOD2 a partir do processo de respiração.....	15
Figura 4. Polimorfismo Ala16Val da SOD2.....	17

RESUMO

Introdução: O desenvolvimento do Câncer de Próstata e seu nível de agressividade têm sido associados com o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, o combate a estas espécies envolve o sistema antioxidante enzimático mitocondrial composto pela Superóxido Dismutase (SOD2), e Glutathione Peroxidase (GPx). Nos seres humanos há um polimorfismo denominado Ala16Val-SOD2, que consiste de três possíveis genótipos: AA (associado a uma elevada atividade da enzima SOD2, com maior produção de peróxido de hidrogênio- H_2O_2) VV (menor atividade da SOD2 com aumento dos níveis do Superóxido - $O_2^{\cdot-}$) e AV (equilíbrio entre ambos). Estudos demonstraram que indivíduos portadores do genótipo AA possuem maior risco de desenvolver Câncer de Próstata. Entretanto, a agressividade ainda não foi avaliada. **Objetivo:** O presente estudo avaliou a associação do polimorfismo Ala16Val-SOD2 e a agressividade do Câncer de Próstata através de dois protocolos, *in vivo* e *in vitro* combinados. **Metodologia:** Inicialmente foi analisado o potencial da associação entre o polimorfismo e a agressividade no momento do diagnóstico. Um segundo estudo foi realizado para investigar o impacto do desequilíbrio da SOD2 sobre a proliferação celular. Células da linhagem DU145 foram expostas a um gradiente de concentração de paraquat e de porfirina a fim de criar uma semelhança observada nos genótipos VV e AA da SOD2. **Resultados:** Portadores do genótipo VV apresentaram uma maior pontuação de Gleason, mostrando-se mais agressivo, comparados do genótipo AA. Na análise *in vitro* somente a porfirina (AA) foi capaz de diminuir a proliferação e inibir significativamente o ciclo celular na fase S. **Conclusão:** Os resultados descritos sugerem que a alteração do estado redox pode ser explorada terapeuticamente no tratamento do Câncer de Próstata, merecendo ser investigado em estudos pré-clínicos e clínicos.

Palavras-chave: Câncer de Próstata, Estresse oxidativo, Paraquat, Polimorfismo, Porfirina, Superoxido dismutase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Próstata

1.1.1. Epidemiologia

O tema de escolha para este trabalho, consiste em um dos grandes males da humanidade, o câncer. O Câncer de Próstata é uma neoplasia altamente prevalente nos homens, sendo considerada a segunda causa de morte do sexo masculino no mundo Ocidental (INCA, 2014).

Mais de 1,1 milhões de novos casos e 300.000 mortes por Câncer de Próstata ocorrem a cada ano em todo o mundo (Chang e cols., 2014; Bashir, 2015). Comparado aos outros tipos, este é conhecido como o câncer da terceira idade, pois em média três quartos dos casos que ocorrem mundialmente acometem os homens a partir dos 65 anos de idade (INCA, 2014).

As maiores taxas de incidência estão localizadas na Austrália, Nova Zelândia, Europa do Norte e Ocidental, e na América do Norte (Chang e cols., 2014).

As estimativas realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o Brasil, em 2014, válidas também para o ano de 2015, apontam que ocorrerão 68.800 casos novos de Câncer de Próstata. A região Sul, lidera o ranking dos mais incidentes, sem considerar os tumores de pele não melanoma, com 91,24 casos a cada 100 mil habitantes, seguida por Sudeste (88,06/100 mil); Centro-Oeste (62,55/100 mil); Nordeste (47,46/100 mil); e Norte (30,16/100 mil). Sendo, o Rio Grande do Sul com maiores números de casos, cerca de 5.740 casos /100mil habitante seguido do Paraná 4.870/100 mil e Santa Catarina 2.220/100 mil (INCA, 2014).

1.1.2. Fatores de Risco

Do mesmo jeito que ocorre para a maioria dos cânceres a etiologia do carcinoma prostático não é bem determinada. Entretanto, existe alguns fatores postulados na sua promoção e início.

- Idade

A idade é um fator de risco importante, ganhando um significado especial no Câncer de Próstata, uma vez que tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam exponencialmente após os 65 anos de idade (Yin e cols., 2008; Wigle e cols., 2008; Park e cols., 2015).

- Raça

É mais frequente em brancos e negros do que em amarelos, particularmente japoneses. Nos EUA é mais comum em negros do que em brancos. Mordukhovich e cols. (2011) investigaram possíveis fatores de risco que determinam esta diferença, entre eles, a susceptibilidade genética e fatores socioeconômicos e ambientais provavelmente contribuem para as diferenças observadas nas taxas de incidência entre etnias (Williams e Powell, 2009; Mordukhovich e cols., 2011).

- Fatores genéticos

Caracterizado como uma herança autossômica dominante. Histórico familiar de pai ou irmão com Câncer de Próstata pode aumentar o risco, duas vezes mais, e se ambos têm é de nove vezes em relação à população em geral. Este fator poderia ser explicado pela presença de variantes genéticas, polimorfismos genéticos, que influenciariam nas rotas metabólicas associadas à etiologia do Câncer de Próstata (Bloom e cols., 2006; Mazdak e cols., 2012)

Os fatores de risco até agora expostos, e que até o momento, são os mais aceitos e estudados, não são passíveis de manipulação para fins de prevenção primária. Em

virtude disto, diversos estudos são realizados no intuito de identificar fatores de risco manipuláveis para tal prevenção. São estes, fatores ambientais e nutricionais (Pouresmaeili e cols., 2014; Wang e cols., 2015). O cálcio, por exemplo, quando ingerido em maior quantidade, é associado a uma maior incidência de neoplasia prostática (Giovanucci e cols., 1998; Tao e cols., 2015). Da mesma maneira, uma dieta rica em nutrientes tais como o Licopeno, Selênio, Vitamina E, Vitamina D têm sido associadas a uma menor incidência de tal neoplasia (Key e cols., 2015; Wang e cols., 2015).

Levando também em consideração que o risco aumenta com a idade, acredita-se que o acúmulo de dano no DNA derivado de exposição crônica a agentes carcinogênicos, como fatores endógenos (variações genômicas) e fatores exógenos (exposições ambientais, de estilo de vida), explicaria a associação entre este tipo de doença e envelhecimento (Troen, 2003; Indo e cols., 2015). Corroborando com esta hipótese, existe uma quantidade relativamente grande de estudos que mostram a presença, em muitos tumores, de modificações no DNA causadas por estes fatores que implicam no equilíbrio de espécies reativas (Valko e cols., 2007; Chaiswing, Zhong e Oberley, 2014).

Assim, várias são as etiologias envolvidas no adenocarcinoma de próstata, e a identificação de fatores prognósticos úteis para esta neoplasia é de extrema importância para a compreensão da doença.

1.1.3. Sintomatologia

Na maioria dos casos o adenocarcinoma da próstata é assintomático, principalmente em estágios iniciais. Porém, com o decorrer do tempo podem surgir dificuldades para expelir a urina, jato urinário fraco, aumento do número de micções

(Corrêa e cols., 2003; Kang e cols., 2015), necessidade imperiosa de urinar, dor e queimação durante a micção entre outros sintomas (Godtman e cols., 2013).

Um em cada nove homens com Câncer de Próstata pode apresentar manifestações clínicas, entretanto, tais sintomas são comuns nos casos de crescimento benigno, de modo que a presença deles não indica, necessariamente, a existência de câncer, exigindo, no mínimo, uma melhor avaliação médica (Johansson e cols., 2004).

Já o adenocarcinoma avançado pode se disseminar pelo corpo provocando metástase a órgãos vizinhos ou à distância, causando com isso, sintomas mais graves. Como, dores no períneo, alterações do funcionamento intestinal, dores ao nível dos rins e nos ossos, cansaço, perda de força e de peso (Corrêa e cols., 2003; Bratt e cols., 2010).

1.1.4. Diagnóstico

Além dos sintomas, o médico precisa reunir outras informações para diagnosticar o tipo de problema que o paciente apresenta. Para isto, vários exames podem ser empregados, Dosagem do Antígeno específico da próstata (PSA), toque retal, ultrassonografia transretal, ressonância magnética, tomografia computadorizada, ecografia, urografia, endoscopia urinária e biópsia (Di Lorenzo e Placido, 2006; Panebianco e cols., 2015).

O toque retal é um exame preventivo que permite avaliar diversos aspectos da próstata. É observado seu tamanho e forma, sua consistência (dureza), sensibilidade, se é muito doloroso, incomodo ou assintomática. A próstata normal é fibroelástica, porém, com atividade neoplásica torna-se firme ou endurecida (Corrêa e cols., 2003; Vida e cols., 2014).

Junto com o toque retal se realiza a dosagem sérica do PSA (Heidenreich e cols., 2011). Produzido pelas células epiteliais das glândulas prostáticas, este se eleva já nas

fases iniciais da doença. Tornando-se de grande utilidade clínica, pois, serve para detecção precoce de adenocarcinoma prostático, estadiamento, avaliação prognóstica e para monitoramento da resposta terapêutica. Em geral, o valor de dedução positiva do PSA, é de 20% em indivíduos com valores inferiores a 4,0 ng/ml e de 60% - 80% em indivíduos com valores superiores a 10 ng/ml (Barouki, 2012; Sertkaya e cols., 2014; Pron, 2015). A busca do diagnóstico precoce visa um tratamento curativo, assumindo fundamental importância, portanto, o toque retal e o exame de PSA devem ser realizados anualmente em todos os homens acima de 45 anos de idade, independente de apresentarem ou não os sintomas (Corrêa e cols., 2003; Pron, 2015).

O “padrão ouro” do diagnóstico do Câncer de Próstata é a biópsia. Realizada sempre que houver uma suspeita de adenocarcinoma e após realizado outros testes de diagnóstico com resultado positivo, tais como, toque retal com suspeita de malignidade, nódulos ou zonas endurecidas; PSA superior a 10 ng/ml, detecção na ecografia de zonas com alterações ecogênicas entre outros (Heidenreich cols., 2011; Kang e cols., 2015). Quando a biópsia confirmar a presença da neoplasia, deve-se proceder à avaliação da extensão e das características do tumor, a fim de se estabelecer o estágio da doença e o seu devido tratamento.

Para diferenciação é observado a graduação histológica que é determinada por uma escala designada de escore de Gleason (Stark e cols., 2009; Epstein, 2010). A partir desta, considera-se que quanto mais diferente a célula cancerosa estiver em relação às células normais, mais agressivo se apresentará o tumor e mais rápida será sua disseminação (True e cols., 2006).

A escala de graduação do Câncer de Próstata varia de 1 a 5:

- Grau 1

As células são geralmente uniformes e pequenas, se parecem muito com a glândula da próstata tecido normal, apresentam-se densamente agrupadas, com bordos bem definidos e com pouco estroma entre elas.

- Grau 2

As células variam em tamanho e forma, apresentam-se em tamanho maior, com glândulas uniformes, frouxamente agrupadas e com bordos irregulares.

- Grau 3

As células variam ainda mais em tamanho e forma, constituindo glândulas muito pequenas individualizadas ou espalhadas pelo estroma; ou fusiformes com bordas lisas.

- Grau 4

A próstata possui poucas glândulas reconhecíveis. Muitas células estão invadindo o tecido circundante.

- Grau 5

A próstata não possui glândulas reconhecíveis. A maioria das células estão agrupadas em grandes massas que invadem os órgãos e tecidos vizinhos.

Para se obter o escore total da classificação de Gleason, que varia de 2 a 10, o patologista deve graduar de 1 a 5 as duas áreas mais frequentes do tumor e somar os resultados. Quanto mais baixo o escore de Gleason, melhor será o prognóstico do paciente (Calvete e cols.,2003; Stark e cols., 2009; Epstein, 2010).

- Gleason de 2 a 4 – existe cerca de 25% de probabilidade do câncer disseminar-se para fora da próstata em 10 anos.
- Gleason de 5 a 7 - existe cerca de 50% de probabilidade do câncer disseminar-se para fora da próstata em 10 anos.

- Gleason de 8 a 10 - existe cerca de 75% de probabilidade do câncer disseminar-se para fora da próstata em 10 anos.

Além da graduação histológica, o estadiamento clínico da neoplasia, tanto para fins de prognóstico como de tratamento, tem enorme importância prática.

O sistema de estadiamento mais amplamente utilizado para o Câncer de Próstata é o *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* sistema (TNM, 2010).

- **T - Tumor Primário**

TX O tumor primário não pode ser avaliado.

T0 Não há evidência de tumor primário.

T1 Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou não visível por meio de exame de imagem.

T1a Achado histológico incidental em 5% ou menos de tecido ressecado.

T1b Achado histológico incidental em mais de 5% de tecido ressecado.

T1c Tumor identificado por biópsia através de agulha (p. ex., devido ao PSA* elevado)

T2 Tumor confinado à próstata.

T2a Tumor que envolve uma metade de um dos lobos ou menos.

T2b Tumor que envolve mais da metade de um dos lobos, mas não ambos os lobos.

T2c Tumor que envolve ambos os lobos.

T3 Tumor que se estende através da cápsula prostática.

T3a Extensão extracapsular (uni- ou bilateral).

T3b Tumor que invade vesícula (s) seminal (ais).

T4 Tumor está fixo ou invade outras estruturas adjacentes, que não as vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores do ânus, ou parede pélvica.

- **N - Linfonodos Regionais**

NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.

N0 Ausência de metástase em linfonodo regional.

N1 Metástase em linfonodo regional.

- **M - Metástase à Distância**

MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.

M0 Ausência de metástase à distância.

M1 Metástase à distância.

M1a Linfonodo (s) não regional (ais).

M1b Osso (s).

M1c Outra (s) localização (ões).

1.1.5. Tratamento

Existem duas formas de tratamento com potencial curativo para o câncer localizado, que são a prostatectomia radical ou a radioterapia (externa ou braquiterapia) (Shahi e Manga, 2006; Bill-Axelson e cols., 2011; Heidenreich e cols., 2014). Estas estão indicadas para os casos (T1 e T2) com prognóstico de vida superior a 10 anos. Nas prostatectomias radicais, toda glândula da próstata é removida, além de uma parte do tecido adjacente. A via de acesso preferida pelos urologistas é a retropúbica, que preserva os feixes vasculonervosos importantes para se evitar perda da potência sexual após a cirurgia (Bill-Axelson e cols., 2011). A radioterapia utiliza raios de alta energia

ou partículas para matar células cancerosas. Na maioria dos casos é indicada para o tratamento de baixo grau que ainda está apenas na próstata. Mas também pode ser indicada no tratamento junto com a terapia hormonal para cânceres que têm crescido fora da próstata e em tecidos circundantes. Pacientes com neoplasias avançadas, a radioterapia auxilia reduzindo o tamanho do tumor e proporcionando alívio de sintomas (Nanda e cols., 2010; Kim e cols., 2015).

No caso de Câncer de Próstata metastático, a terapia endócrina ou hormonoterapia é o tratamento mais indicado (Kaliks e Giglio, 2008; Schulman e cols., 2015). Nesta terapia são empregados vários medicamentos à base de hormônios (estrógenos, análogos da LHRH e antiandrógenos), que impedem a produção de testosterona ou bloqueiam as suas ações na próstata (Akaza e cols., 2009). A castração (orquiectomia), que é a retirada cirúrgica dos testículos, também é utilizada como hormonoterapia, já que elimina os órgãos que produzem o hormônio masculino, este apontado como principal responsável pelo crescimento do tumor (Shahi e Manga, 2006; Schulman e cols., 2015).

A quimioterapia em muitos casos, é iniciada com docetaxel combinada com prednisona. Se a doença não responder, é iniciado o tratamento com cabazitaxel (de Bono e cols., 2010; Ning e cols., 2010). Ambos medicamentos aumentam a sobrevida, podendo retardar o crescimento do tumor e reduzir os sintomas, resultando em uma melhor qualidade de vida.

Novas linhas de tratamento vêm sendo constantemente estudadas. Esses tratamentos visam atingir o câncer através de diferentes mecanismos. Um deles é a imunoterapia, que tem como objetivo aproveitar a capacidade do sistema imunológico para reconhecer de forma eficaz e matar as células cancerosas, enquanto os tecidos

saudáveis são poupados (Vesely e cols., 2011; Dubensky e cols., 2012; Silvestri e cols., 2015).

1.2. Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Radicaís livres (RL) são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa da eletrosfera (Halliwell, 2006; Shao e cols., 2012), conferindo assim, um alto poder de reatividade. Outras moléculas além do oxigênio, como o carbono, o enxofre e o nitrogênio também podem produzir RL ou espécies reativas, no entanto, o oxigênio é o que mais recebe atenção, dada sua importância nos processos metabólicos celulares (Halliwell, 2006; Dröse e Brandt, 2012)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. O desequilíbrio entre a formação e remoção dessas espécies é decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos e exógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes, que gera um estado pró-oxidante, chamado de estresse oxidativo (Warnholtz e cols., 2004; Valko e cols., 2007; Dröse e Brandt, 2012).

O estresse oxidativo favorece a ocorrência de ataques das EROs a componentes celulares, podendo resultar em lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de órgãos, tecidos e células. Este se mostra presente em uma grande variedade de condições patológicas e acredita-se que funcione como agente patogênico em muitas dessas condições (Victor e cols., 2009; Bakalova e cols., 2013).

Todos os componentes celulares são vulneráveis a ação das EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica (lipoperoxidação) que ocorre por 3 etapas: Iniciação, o hidrogênio do ácido graxo

insaturado do fosfolípido de membrana é removido por uma EROs produzindo o radical lipídico; na fase seguinte de propagação, o radical lipídico gerado reage com o oxigênio molecular formando o radical peroxila (LOO^{\cdot}), este processo pode dar início a um novo processo de remoção de hidrogênio de uma nova molécula de ácido graxo. E pôr fim, a fase de término, no qual gera outros produtos que podem reagir com as bases nitrogenadas do DNA, sendo um agente mutagênico (Valko e cols., 2007; Niki, 2009). Este, gera por sua vez alterações na permeabilidade, fluidez e integridade da membrana celular. Causando perda na seletividade, na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, podendo culminar a morte celular (Cherubini e cols., 2005; Saito e cols., 2015).

As enzimas e proteínas também são atacadas pelas EROs. Podem atacar os resíduos de aminoácidos (cisteína, prolina, arginina, treonina e lisina) para produzir grupos carbonila (Maisonneuve e cols., 2009). As alterações provocadas modificam a atividade biológica das macromoléculas, especialmente das enzimas. As células que apresentam as membranas danificadas ficam sujeitas a citólise, apoptose e acabam prejudicadas no transporte ativo de substâncias (Pilka e cols., 2009; Suzuki, Carini e Butterfiel 2010).

As EROs oxidam o DNA por atingir as bases nitrogenadas e/ou as moléculas de açúcares. Provocando danos na quebra das fitas duplas e a formação de sítios abásicos (sítios com perda de bases nitrogenadas). As lesões no DNA podem resultar tanto na inativação quanto na ativação da sua transcrição, replicação de erros e instabilidade genômica, todas essas alterações podem ser associadas a carcinogênese, mutagênese e no envelhecimento (Spencer e cols., 2002; Valko e cols., 2007).

Dessa forma, a existência de um mecanismo de defesa e reparo é de extrema importância, visto que, lesões oxidativas podem se tornar letais para as células.

1.3. Defesas antioxidantes

As células humanas têm a capacidade de desenvolver um elaborado mecanismo de defesa, para combater a intensa produção de espécies reativas de oxigênio. Este mecanismo é denominado sistema de defesa antioxidante, que atua na prevenção e reparo físico e químico dos danos oxidativos nos diversos sistemas orgânicos (Valko e cols., 2007; Shao e cols., 2012).

Podem ocorrer por meio de mecanismos endógenos (antioxidantes enzimáticos), que são produzidos pelo organismo humano. Sendo o conjunto das principais enzimas envolvidas neste processo a glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (Cai e cols., 2004; Crawford e cols., 2011; Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013). Também podem ocorrer por mecanismos exógenos (não-enzimáticos), que são antioxidantes provenientes da alimentação e não produzidos pelo organismo. São representados pela glutathione reduzida (GSH) tióis não-proteicos, ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E) (Takebe e cols., 2002; Shao e cols., 2012).

Portanto, os antioxidantes são todas as substâncias capazes de diminuir ou inibir a oxidação do substrato passível de ser oxidado. Protegendo o sistema biológico contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou de estruturas celulares (Brambilla e cols., 2008; Shao e cols., 2012).

1.4. Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD é uma enzima antioxidante endógena que desempenha um importante papel uma vez que, catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Ambrosone e cols., 1999). Já o H_2O_2 é degradado pelas enzimas CAT ou GPx resultando em água e oxigênio (O_2) (Figura 1) (Valko e cols., 2007; Shao

e cols., 2012; Brigelius-Flohé e Maiorino, 2013). Entretanto, uma parcela do H_2O_2 não é inativada, e através das reações não enzimáticas de Fenton e Haber-Weiss, combina-se com ferro livre circulante formando o radical hidroxila (OH^\cdot), provável EROs mais nociva e para qual não possuímos enzimas antioxidantes específicas (Ambrosone e cols., 1999; Buggisch e cols., 2007).

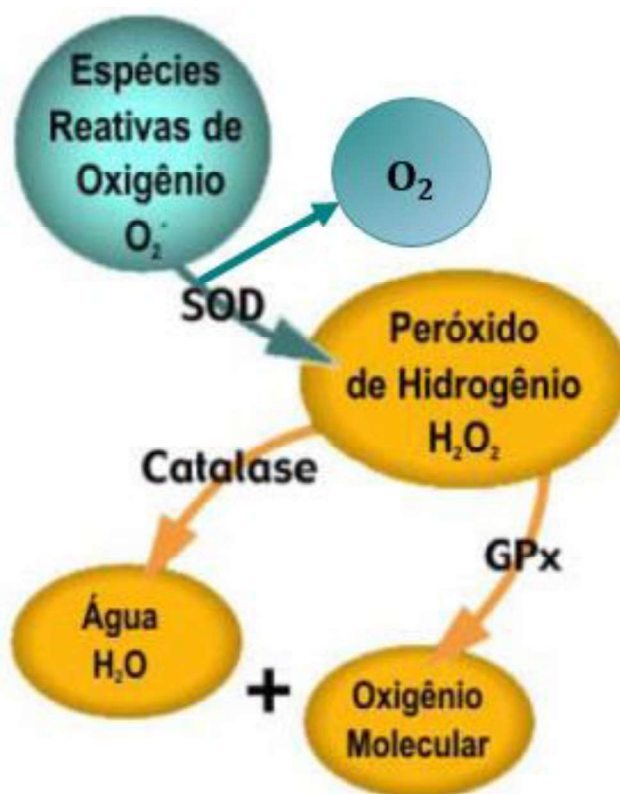


Fig 1. Mecanismo enzimático antioxidante (Adaptada Tese Duarte, 2010).

A SOD possui 3 isoenzimas, as quais são classificadas de acordo com a sua localização e do metal componente: SOD1 (CuZnSOD), SOD2 (MnSOD) e SOD3 (EcSOD) (Figura 2) (Weisiger e Fridovich, 1973; Fukai e Ushio-Fukai, 2011).

A SOD1 é uma enzima citosólica dependente de cobre e zinco, presente no cromossomo 21 em seres humanos e com peso molecular de aproximadamente 32.000 Da, é encontrada no citoplasma, compartimentos nucleares e lisossomos de células de mamíferos (Zelko, Mariani e Folz, 2002; Dröse e Brandt, 2012).

A SOD2 é uma enzima mitocondrial dependente de manganês, localizada no cromossoma 6 em humanos e com peso molecular de 23.000 Da. A enzima SOD2 tem demonstrado desempenhar um importante papel supressor de tumor no câncer de próstata, mama e cólon (Duan e cols., 2003; Gallagher e cols., 2009; Majima e Toyokuni, 2012).

A SOD3 é uma enzima extracelular dependente de cobre e zinco, presente no cromossomo 4 de seres humanos e com peso molecular de 135.000 Da. Previne os danos teciduais e celulares iniciados pelas EROs que são produzidos no meio extracelular. Pode proteger contra a fibrose pulmonar e outras doenças mediadas por superóxido extracelular (Zelko, Mariani e Folz, 2002; Gao e cols., 2008).

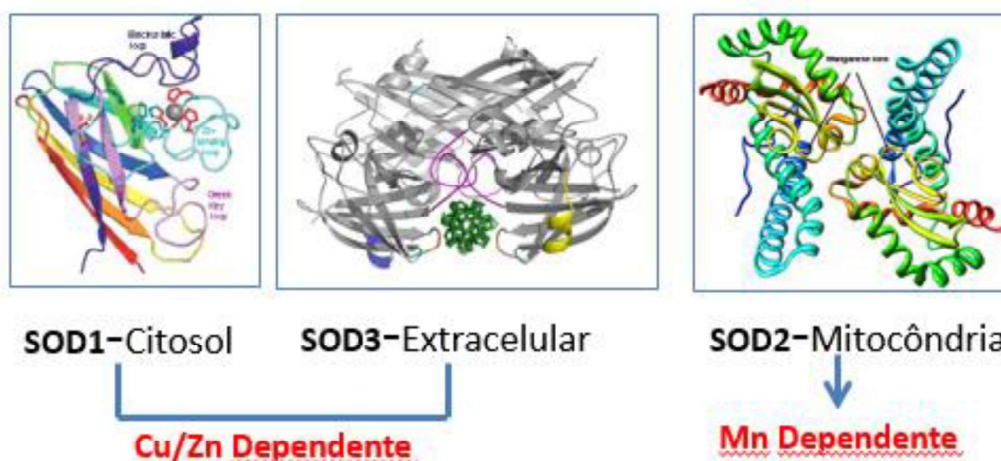


Fig 2. Superóxido dismutase (Adaptada apresentação de qualificação de Mestrado

Fernanda Barbisan, 2013).

1.5. Polimorfismo da SOD2

Em condições normais, a concentração intracelular das EROs é extremamente baixa devido a ação de enzimas antioxidantes que as removem ou impedem sua formação. Dentro da mitocôndria, a superóxido dismutase dependente de manganês

(SOD2) proporciona uma defesa contra o dano oxidativo causado pelas EROs (Ambrosone e cols., 1999; Shao e cols., 2012).

No metabolismo energético, cerca de 5% do oxigênio inalado acaba não participando das rotas metabólicas mitocondrias envolvidas com a síntese de adenosina tri-fosfato (ATP) e pela ação de enzimas como a NADPH oxidases que origina radicais superóxidos (Cai e cols., 2004) (Figura 3).

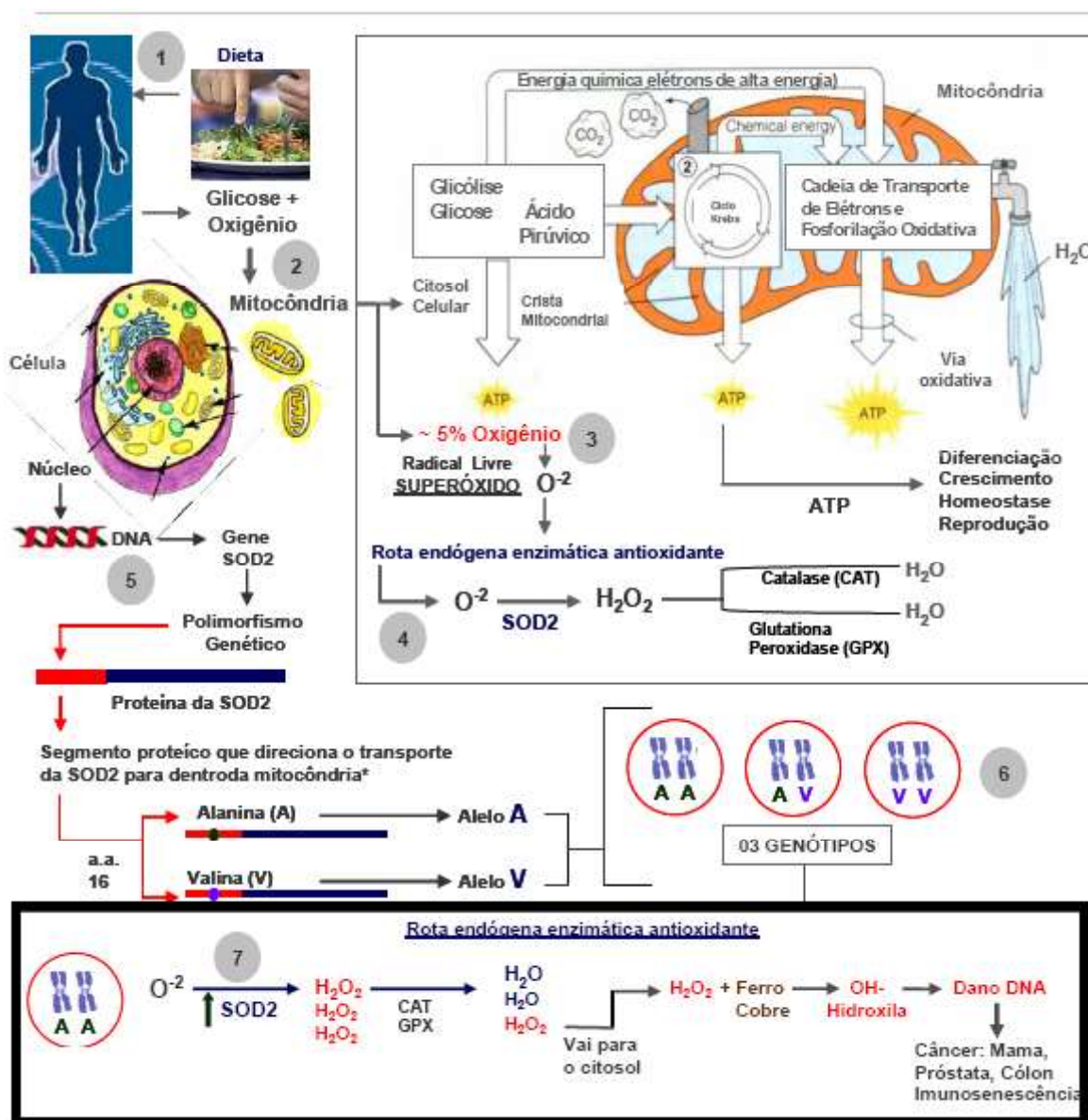


Fig 3. Desenho esquemático da formação da SOD2 a partir do processo de respiração

(Adaptada Tese Bica, 2008).

Como podemos observar na figura 3, os organismos aeróbios como é o caso dos seres humanos (1) extraem energia a partir da glicose (obtida através da dieta) e oxigênio absorvido através das vias respiratórias. A síntese de adenosina tri-fosfato (ATP) ocorre na mitocôndria (2) através da ação de ciclos metabólicos que produzem no final está molécula, e como subproduto água e dióxido de carbono.

Aproximadamente 5% do oxigênio que chega até as mitocôndrias (3) não é utilizado no processo de síntese de ATP e transforma-se em EROs. Por ser uma molécula altamente reativa que, potencialmente, causa oxidação de moléculas que participam da estrutura e função celular, o superóxido é dismutado em peróxido de hidrogênio e O₂ pela SOD2 (4).

O produto do gene da SOD2 é nuclear (5), isto é, a síntese da enzima necessariamente ocorre pela transcrição e processamento de uma molécula de mRNA que vai para o retículo endoplasmático rugoso e neste local produz uma proteína da SOD2 não-funcional. Esta proteína possui um segmento proteico (*mitochondrial target sequence*, MTS) que serve para direcionar o transporte da SOD2 para dentro da mitocôndria (6). No códon que determina o aminoácido na posição 16 do MTS da SOD2 existe um polimorfismo Ala16Val, que se origina por uma mutação estrutural no gene. Este polimorfismo de um único nucleótido (SNP) (rs4880) ocorre na sequência alvo da enzima SOD2, onde uma substituição de citosina por uma timina na sequência codificadora, converte o códon GCT (alanina) para GTT (valina) (Figura 4) provocando uma alteração conformacional de folha-beta para alfa-hélice, o que compromete a capacidade de neutralizar os radicais superóxidos (Wispé e cols., 1989; Ambrosone e cols., 1999; Sutton e cols., 2003; Taufer e cols., 2005; Barbisan e cols., 2014).

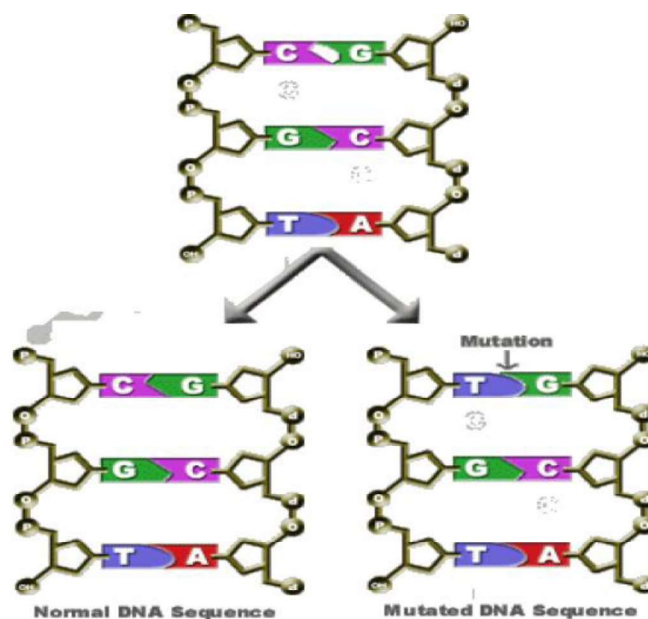


Fig 4. Polimorfismo Ala16Val da SOD2 (Adaptada de Rosenblum, Gilula e Lerner, 1996).

Uma vez que herdamos este polimorfismo, os possíveis genótipos que ocorrem nas populações humanas são: AA, AV e VV. As investigações bioquímicas e moleculares sugeriram que o alelo A apresenta uma estrutura proteica α -hélice que se torna mais eficiente no transporte da SOD2 do citosol para o interior da mitocôndria e também na metabolização do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (Sutton e cols., 2003; Taufer e cols., 2005). No entanto, tais resultados parecem contraditórios, uma vez que estudos epidemiológicos sugerem associação do genótipo AA com um risco maior de desenvolver câncer de próstata, mama e colón (Bica e cols., 2009; Wang e cols., 2009; Sun e cols., 2013; Chaiswing, Zhong e Oberley, 2014). Uma hipótese para explicar estes resultados seria que a maior taxa de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 não causaria uma regulação compensatória das enzimas catalase e glutathione peroxidase na metabolização desta molécula em água (Wang e cols., 2009).

A variante valina (Ala/Val ou Val/Val) apresenta uma estrutura β -hélice pregueada, dificultando assim o seu transporte para o espaço mitocondrial, e desta

forma, reduzindo a sua atividade antioxidante (Shimoda-Matsubayashi e cols., 1996; Barbisan e cols., 2014).

Portanto, a lesão do DNA mitocondrial causada pelo estresse oxidativo merece destaque pelo fato da mitocôndria ser a principal fonte de EROs. Por essa razão, o DNA está exposto a altos níveis de espécies reativas, promovendo mutações nos genes das próprias enzimas antioxidantes e causando danos no organismo.

1.6. Polimorfismos da SOD2 e o Câncer de Próstata

Diversos estudos são apresentados relacionando polimorfismos genéticos, perfil oxidativo e câncer de próstata (Van e cols., 1999; Sun e cols., 2013; Paschos e cols. 2013; Chaiswing, Zhong e Oberley, 2014).

As EROs provavelmente induzem o surgimento de neoplasias por duas rotas: 1) causando danos na estrutura do DNA, levando a deleção, adição ou substituição de bases nitrogenadas, mutando o DNA, a denominada rota genética; ou, 2) modificando a expressão de um determinado gene. É o que pode ocorrer, como por exemplo, se um gene de supressão tumoral for silenciado ou tiver sua expressão gênica diminuída através da indução, pelas EROs, de mecanismos regulatórios existentes no desenvolvimento humano (Lee e cols., 1994).

Algumas metanálises têm sugerido que a associação entre o câncer de próstata e o polimorfismo Ala16Val-SOD2 é controverso, pois alguns estudos encontraram uma associação entre este polimorfismo (Sun e cols., 2013; Blarigan e cols., 2014), enquanto outros não encontraram nenhuma relação (Liwei, Chunyu e Ruifa, 2009; Ding e cols., 2012).

Uma pesquisa realizada por Margalit e cols. (2015) sugeriu uma ligação entre três polimorfismos da SOD2 (rs6917589, rs2758331 e rs4880) e morte por Câncer de

Próstata ou metástases à distância. Outros estudos como de Chaiswing, Zhong e Oberley (2014) apoiam a hipótese de que a SOD2 e o Câncer de Próstata estão associados e que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na carcinogênese prostática.

Entretanto, alguns estudos sugerem que a SOD2 tem um importante papel supressor de tumor no câncer de próstata e pode ser utilizado como terapia genética para o tratamento da neoplasia (Duan e cols., 2003; Majima e Toyokuni, 2012).

Bica e cols. (2009) descreveram uma relação entre o genótipo AA e risco de câncer de mama e o genótipo VV na agressividade do câncer. Ergen e cols. (2007) investigaram pacientes turcos e encontraram esta relação entre o genótipo AA e o risco de Câncer de Próstata, mas nenhuma associação foi realizada entre a agressividade dos diferentes genótipos do Ala16Val-SOD2.

Estes dados contraditórios encontrados na literatura, podem ser devido à forte influência de fatores ambientais, como alimentação, atividade física, bem como a origem étnica entre outros fatores (Bresciani e cols., 2013; Wang e cols., 2015). Numa investigação realizada por Mikhak e cols. (2008), não foi encontrado nenhuma associação geral entre o polimorfismo da SOD2 e o risco de Câncer de Próstata. No entanto, os portadores do sexo masculino do genótipo AA que tiveram baixo status de licopeno ao longo prazo, apresentaram um risco maior de Câncer de Próstata quando comparados aos homens que tinham o hábito de consumir vegetais ricos em moléculas antioxidantes (Mikhak e cols., 2008).

Desta forma, o estresse oxidativo vem sendo correlacionado à ocorrência de processos neoplásicos no organismo, sendo considerado atualmente um importante fator de risco associado à carcinogênese (Spencer e cols., 2002; Valko e cols., 2007; Bakalova e cols., 2013), uma vez que a modulação do estresse oxidativo pode ocorrer

por diversas variantes genéticas, ambientais ou gene-ambiente. Por tanto, consideramos que investigar o papel do polimorfismo da SOD2 é de grande relevância, uma vez que, pode estar relacionado com o prognóstico e manejo terapêutico desta neoplasia.

1.7. Miméticos do polimorfismo da SOD2

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos compostos com a capacidade de mimetizar as propriedades funcionais da SOD, para melhor compreensão do mecanismo da enzima (Day e cols., 1995; Melchiorri e cols., 1996; Celic e cols., 2014; Shah e cols., 2015). Várias classes miméticas da SOD têm demonstrado efeitos benéficos notáveis em diferentes modelos de estresse oxidativo, quer em cultura de células ou em modelos animais (Melchiorri e cols., 1996; Miriyala e cols., 2012; Celic e cols., 2014).

As porfirinas existem na natureza como parte de três grupos de compostos: clorofila, vitamina B12 (cobalamina) e o grupo heme. São estruturas muito similares e só se diferenciam pelo metal que cada uma contém, a clorofila magnésio, a cobalamina cobalto e o heme ferro. Estas são miméticas da SOD de eficácia bem estabelecida, disponíveis comercialmente. A porfirina faz com que aumente a taxa de conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , produzindo quimicamente uma situação parecida com a do genótipo AA (Miriyyala e cols., 2012).

Thomas e Sharifi (2012) investigaram os efeitos da SOD na expressão e função de receptores de andrógenos (AR), que são considerados vitais para a progressão do câncer de próstata. Os resultados mostraram-se bastante promissores, já que, os miméticos da SOD tiveram capacidade de suprimir a função de AR, podendo assim, ser benéfico no tratamento da neoplasia.

Já o paraquat é um composto quaternário do amônio (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto) utilizado como herbicida e altamente perigoso, produzindo lesões

degenerativas no pulmão após administração sistêmica em seres humanos e animais. A toxicidade pulmonar do paraquat de várias maneiras se assemelha a toxicidade de outras toxinas pulmonares, incluindo o oxigênio. Ele possui duas consequências potencialmente importantes para o desenvolvimento da toxicidade: geração de EROs (por exemplo, radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila), que é altamente reativo a macromoléculas celulares; ou oxidação de equivalentes redutores (por exemplo, NADPH, GSH) necessárias para a função celular normal. Nas células ele age interferindo na transferência de elétrons por redução de doadores tais como NADPH na mitocôndria, aumentando assim os níveis de $O_2^{\cdot-}$, mimetizando o genótipo VV do polimorfismo da SOD2 (Bus e Gibson, 1984).

De acordo com a literatura pode ser considerado um modelo potencialmente útil para a avaliação de mecanismos de toxicidade oxidantes (Jung e Kim, 2003; Fahim e cols., 2013; Lu e cols., 2014). Como o estudo realizado por Day e cols. (1995) que investigou miméticos da SOD contra lesões na célula por produção de superóxido induzido pelo paraquat. Ele diminuiu a concentração de glutatona oxidada em pulmão e fígado, demonstrando mais uma vez, que os miméticos da SOD podem ser úteis no desenvolvimento de novas formas de prevenção de lesões e doenças associadas ao estado redox.

Contudo, de acordo com as buscas realizadas na literatura, nenhum estudo foi realizado avaliando o efeito no desbalanço da produção de superóxido e peróxido de hidrogênio gerado pelo polimorfismo da SOD2 em neoplasias prostáticas. Também não foi encontrado estudos concomitantes entre uma análise *in vivo e in vitro* na agressividade tumoral do Câncer de Próstata associada ao polimorfismo Ala16Val SOD2.

1.8. Referências bibliográficas

Akaza H, Hinotsu S, Usami M, Arai Y, Kanetake H, Naito S, *et al.* Combined androgen blockade with bicalutamide for advanced prostate cancer: long-term follow-up of a phase 3, double-blind, randomized study for survival. *Cancer*. 2009 Aug;115(15):3437-45.

Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vepa JE, Marshall JR, *et al.* Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res*. 1999 Feb; 59: 602-606.

American Joint Committee on Cancer. Prostate. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer; 2010:457-464.

Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I, Saga T. Tissue redox activity as a hallmark of carcinogenesis: from early to terminal stages of cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 May; 19(9): 2503-2517.

Barbisan F, Rosso JM, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, *et al.* Methotrexate-Related Response on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism. *PLoS One*. 2014 Oct; 9(10): e107299.

Barouki MP. Rastreamento do câncer de próstata em homens acima de 50 anos através do exame diagnóstico de PSA. *Revista Eletrônica Gestão & Saúde*. 2012; 03: 982-4785.

Bashir MN. Epidemiology of Prostate Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16(13): 5137-5141.

Bica CG. Associação do Polimorfismo Ala-9Val do Gene da Enzima Superóxido Dismutase Dependente de Manganês (MnSOD) com Câncer de Mama. 2008. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Bica CG, de Moura da Silva LL, Toscani NV, da Cruz IB, Sá G, Graudenz MS, *et al.* MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. *Pathol Oncol Res*. 2009; 15(1): 19-24.

Bill-Axelsson A, Holmberg L, Ruutu M, Garmo H, Stark JR, Busch C, *et al.* Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *Med*. 2011, May; 364(18): 1708-17.

Blarigan ELV, Ma J, Kenfield AS, Stampfer MJ, Sesso HD, Giovannucci EL, *et al.* Plasma antioxidants, genetic variation in SOD2, CAT, GPX1, GPX4, and prostate cancer survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014 Jun; 23(6): 1037–1046.

Bloom JR, Stewart SL, Oakley GI, Banks PJ, Chang S. Family history, perceived risk, and prostate cancer screening among African American men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Nov;15(11):2167-2173.

Brambilla D, Mancuso C, Scuderi MR, Bosco P, Cantarella G, Lempereur L, *et al.* The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. *Nutr J.* 2008; 30: 7-29.

Bratt O, Garmo H, Adolfsson J, Bill-Axelsson A, Holmberg L, Lambe M, Stattin P. Effects of prostate-specific antigen testing on familial prostate cancer risk estimates. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Sep; 102(17): 1336-43.

Bresciani G, Cruz IB, de Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res.* 2013; 47(10): 781-792.

Brigelius-Flohé R., Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013 May; 1830(5): 3289–3303.

Buggisch M, Ateghang B, Ruhe C, Strobel C, Lange S, Wartenberg M, *et al.* Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J Cell Sci.* 2007 Mar;120: 885–94.

Bus JS, Gibson JE. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect.* 1984; 55: 37-46.

Cai Q, Shu XO, Wen W, Cheng JR, Dai Q, Gao YT, *et al.* Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. 2004 Sep; 6(6): 647-655.

Calvete AC, Srougi M, Nesrallah LJ, Dall'Oglio MF, Ortiz V. Extraprostatic disease prediction in patients with carcinoma of the prostate: role of PSA, prostatic biopsy fragments percentage and Gleason score. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2003 Sep; 49 (3).

Celic T, Španjol J, Bobinac M, Tovmasyan A, Vukelic I, Reboucas JS, I. *et al.* Mn porphyrin-based SOD mimic, MnTnHex-2-PyP5+, and non-SOD mimic, MnTBAP3–, suppressed rat spinal cord ischemia/reperfusion injury via NF-κB pathways. *Free Radic Res.* 2014 Dec; 48(12): 1426–1442.

Chaiswing L, Zhong W, Oberley TD. Increasing discordant antioxidant protein levels and enzymatic activities contribute to increasing redox imbalance observed during human prostate cancer progression. *Free Radic Biol Med.* 2014; 67: 342-352.

Chang ET, Boffetta P, Adami HO, Cole P, Mandel JS. A critical review of the epidemiology of Agent Orange/TCDD and prostate cancer. *Eur J Epidemiol.* 2014 Oct; 29(10): 667-723.

Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential Markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biol Med.* 2005 Oct; 39(7):841-852.

Corrêa NAB, Costa GFM, Massambani EM, Matumoto FH, Paula MMM. Diagnóstico precoce de carcinoma de próstata: antígeno prostático específico (PSA), um marcador quase ideal. *Rev. Bras. Anál. Clín.* 2003; 35(2): 63-64.

Crawford A, Fassett RG, Coombes JS, Kunde DA, Ahuja KD, Robertson IK, *et al.* Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase genotypes and activities and the progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Sep;26(9):2806-2813.

Day BJ, Shawen S, Liochev SI, Crapo JD. A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic protects against paraquat-induced endothelial cell injury, *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Dec;275(3):1227-32.

De Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JH, Shen L, *et al.* Cabazitaxel or mitoxantrone with prednisone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) previously treated with docetaxel: Final results of a multinational phase III trial (TROPIC). *J Clin Oncol.* 2010; 28:7s.

Di Lorenzo G, De Placido S. Hormone refractory prostate cancer (HRPC): present and future approaches of therapy. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006 Mar;19(1): 11-34.

Ding G, Liu F, Shen B, Feng C, Xu J, Ding Q. The association between polymorphisms in prooxidant or antioxidant enzymes (myeloperoxidase, SOD2, and CAT) and genes and prostate cancer risk in the Chinese population of Han nationality. *Clin Genitourin Cancer.* 2012 Dec;10(4):251-5.

Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 748:145–169.

Duan H, Zhang HJ, Yang JQ, Oberley LW, Futscher BW, Domann FE. MnSOD up-regulates maspin tumor suppressor gene expression in human breast and prostate cancer cells. *Antioxid Redox Signal.* 2003; 5(5): 677-688.

Duarte MMMF. Polimorfismo do Ala16Val MnSOD na hipercolesterolemia e sua associação com biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo. 2010. 148 p. Tesde (Doutorado em ciências biológicas: Bioquímica toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

Dubensky TW, Skoble J, Lauer P, Brockstedt DG. Killed but metabolically active vaccines. *Curr Opin Biotechnol.* 2012 Dec;23(6):917-23.

Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *J Urol.* 2010; 183:433-440.

Ergen HA, Narter F, Timirci O, Isbir T. Effects of manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism on prostate cancer: a case-control study. *Anticancer Res.* 2007 Apr; 27(2): 1227-1230.

Fahim MA, Howarth FC, Nemmar A, Qureshi MA, Shafiullah M, Jayaprakash P, *et al.* Vitamin E ameliorates the decremental effect of paraquat on cardiomyocyte contractility in rats. *PLoS One.* 2013;8(3): e57651.

Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(6):1583–1606.

Gallagher C, Ahn K, Knipe AL, Dyer AM, Richie JP, Lazarus P, *et al*. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking, and lung cancer risk. *Free Radic Biol Med*. 2009 Jan; 46(1): 20–24.

Gao F, Kinnula VL, Myllärniemi M, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Feb;10(2):343–354.

Giovannucci E, Rimm EB, Wolk A, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, *et al*. Calcium and fructose intake in relation to prostate cancer. *Cancer Res* 1998 Feb;58(3):442-447.

Godtman R.A., Holmberg E., Khatami A., Stranne J., Hugosson J. Outcome following active surveillance of men with screen-detected prostate cancer. Results from the Goteborg randomised population-based prostate cancer screening trial. *Eur Urol*. 2013;63: 101–107.

Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol*. 2006 Jun; 141(2): 312–322.

Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, *et al*. EAU guidelines on prostate cancer. part 1:screening, diagnosis, and local treatment with curative intentupdate 2013. *Eur Urol*. 2014;65: 124–137.

Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, *et al*. EAU guidelines on prostate cancer. Part I: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Actas Urol Esp*. 2011 Oct; 35(9):501-514.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf> > Acesso em: 17 abril 2014.

Indo HP, Yen HC, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Yumiko Nagano Y, *et al*. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr*. 2015 Jan; 56(1): 1–7. *J Urol*. 2008 Mar;179(3):892-895.

Johansson J.E., Andrén O., Andersson S.O., Dickman P.W., Holmberg L., Magnuson A. Natural history of early, localized prostate cancer. *JAMA*. 2004; 291:2713–2719.

Jung IL, Kim IG. Thiamine protects against paraquat-induced damage: scavenging activity of reactive oxygen species. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2003 Dec;15(1):19-26.

Kaliks RA, Giglio AD. Management of advanced prostate cancer. *Ver Assoc Med Bras*. 2008 Apr; 54 (2): 178-82.

Kang BJ, Jeun M, Jang GH, Song SH, Jeong IG, Kim CS, *et al*. Diagnosis of prostate cancer via nanotechnological approach. *Int J Nanomedicine*. 2015; 10: 6555–6569.

Key TJ, Appleby PN, Travis RC, Albanes D, Alberg AJ, Barricarte A, *et al.* Endogenous Hormones Nutritional Biomarkers Prostate Cancer Collaborative Group. Carotenoids, retinol, tocopherols, and prostate cancer risk: pooled analysis of 15 studies. *Am J Clin Nutr.* 2015 Nov;102(5):1142-1157.

Kim DS, Jeon SH, Chang SG, Lee SH. Comparison of biochemical recurrence in prostate cancer patients treated with radical prostatectomy or radiotherapy. *Korean J Urol.* 2015 Oct; 56(10): 703–709.

Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, *et al.* Cytine methylation of regulatory sequences near the pi class glutathione s-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 Nov; 91(24):11733-37.

Liwei L, Chunyu L, Ruifa H. Association between manganese superoxide dismutase gene polymorphism and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Urology.* 2009; 74(4): 884-888.

Lu H, Chang Z, Han W, Wang L, Hong G. Curcumin reduces paraquat-induced oxidative injury in A549 cells by activation of the Nrf2-ARE pathway. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 2014 Jan;32(1):44-9.

Maisonneuve E, Ducret A, Khoueiry P, Lignon S, Longhi S, Talla E, Dukan S. Rules governing selective protein carbonylation. *Plos one.* 2009 Oct; 4(10): e7269.

Majima HJ, Toyokuni S. Mitochondria and free radical studies on health, disease and pollution. *Free Radic Res.* 2012 Aug;46(8):925-926.

Margalit DN, Jordahl KM, Werner L, Wang X, Gwo-Shu LM, Penney KL, *et al.* Germ Line Variation in Superoxide Dismutase-2 (SOD2) and Survival Outcomes After Radiation Therapy for Prostate Cancer: Results of a Test and Validation Set Analysis. *Clin Genitourin Cancer.* 2015; 13(4): 370-377.

Mazdak H, Mazdak M, Jamali L, Keshteli NH. Determination of Prostate Cancer Risk Factors in Isfahan, Iran: a Case - control Study. *Med Arh.* 2012; 66(1): 45-48.

Melchiorri D, Reiter RJ, Sewerynek E, Hara M, Chen L, Nisticò G. Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin. *Biochem Pharmacol.* 1996 Apr 26;51(8):1095-9.

Mikhak B, Hunter DJ, Spiegelman D, Platz EA, Wu K, Erdman JW, *et al.* Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2008 Dec; 29(12): 2335-2340.

Miriyala S, Spasojevic I, Tovmasyan A, Salvemini D, Vujaskovic Z, St Clair D, *et al.* Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May; 1822(5): 794-814.

Mordukhovich I, Reiter PL, Backes DM, Family L, McCullough LE, O'Brien KM, Razzaghi H, Olshan AF. A review of African American-white differences in risk factors for cancer: prostate cancer. *Cancer Causes Control*. 2011 Mar; 22(3): 341–357.

Nanda A, Chen MH, Moran BJ, Braccioforte MH, Dosoretz D, Salenius S. *et al*. Total androgen blockade versus a luteinizing hormone-releasing hormone agonist alone in men with high-risk prostate cancer treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Apr;76(5):1439-44.

Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic. Biol. Med*. 2009; 47: 469–484.

Ning YM, Gulley JL, Arlen PM, Woo S, Steinberg SM, Wright JJ, *et al*. Phase II trial of bevacizumab, thalidomide, docetaxel, and prednisone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:2070-2076.

Panebianco V, Barchetti F, Sciarra A, Ciardi A, Indino EL, Papalia R, *et al*. Multiparametric magnetic resonance imaging vs. standard care in men being evaluated for prostate cancer: A randomized study. *Urol Oncol*. 2015 Jan;33(1):1–7.

Park SY, Haiman CA, Cheng I, Park SL, Wilkens LR, Kolonel LN, *et al*. Racial/ethnic differences in lifestyle-related factors and prostate cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. *Cancer Causes Control*. 2015 Oct;26(10):1507-15.

Paschos A, Pandya R, Duivenvoorden WC, Pinthus JH. Oxidative stress in prostate cancer: changing research concepts towards a novel paradigm for prevention and therapeutics. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013 Sep;16(3):217–225.

Pilka ES, Niesen FH, Lee WH, El-Hawari Y, Dunford JE, Kochan G, *et al*. Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. *Plos One*. 2009 Oct; 4(10): e 7113.

Pouresmaeili F, Hosseini SJ, Farzaneh F, Karimpour A, Azargashb E, Yaghoobi M, *et al*. Evaluation of environmental risk factors for prostate cancer in a population of Iranian patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(24):10603-5.

Pron G. Prostate-Specific Antigen (PSA) - Based Population Screening for Prostate Cancer: An Evidence-Based Analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*. 2015 May; 15(10): 1-64.

Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, p. 4471-4473, 1996.

Saito Y, Shichiri M, Hamajima T, Ishida N, Mita Y, Nakao S, *et al*. Enhancement of lipid peroxidation and its amelioration by vitamin E in a subject with mutations in the SBP2 gene. *J Lipid Res*. 2015 Nov; 56(11): 2172–2182.

Schulman C, Cornel E, Matveev V, Tammela TL, Schraml J, Bensadoun H, *et al*. Intermittent Versus Continuous Androgen Deprivation Therapy in Patients with Relapsing or Locally Advanced Prostate Cancer: A Phase 3b Randomised Study (ICELAND). *Eur Urol*. 2015 Oct;(15)00977-X.

Sertkaya Z, Öztürk MIK, Koca O, Güneş M, Karaman MI. Predictive values for extracapsular extension in prostate cancer patients with PSA values below 10 ng/mL. *Turk J Urol.* 2014 Sep; 40(3): 130–133.

Shah MH, Liu GS, Thompson EW, Disting GJ, Peshavariya HM. Differential effects of superoxide dismutase and superoxide dismutase/catalase mimetics on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Apr;150(3):523-34.

Shahi PK, Manga GP. Cáncer de próstata metastático. *Oncología.* 2006 Dez; 2(3): 398-404.

Shao D, Oka S, Brady CD, Haendeler J, Eaton P, Sadoshima J. Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Mar; 52(3): 550–558.

Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 226(2): 561-565.

Silvestri I, Cattarino S, Aglianò AM, Collalti G, Sciarra A. Beyond the Immune Suppression: The Immunotherapy in Prostate Cancer. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 794968.

Spencer JP, Whiteman M, Jenner P, Halliwell B. 5-s-Cysteinyl-conjugates of catecholamines induce cell damage, extensive DNA base modification and increases in caspase-3 activity in neurons. *J Neurochem.* 2002 Apr; 81(1): 122-129.

Stark JR, Perner S, Stampfer MJ, Sinnott JA, Finn S, Eisenstein AS, *et al.* Gleason score and lethal prostate cancer: does 3 + 4 = 4 + 3? *J Clin Oncol.* 2009 Jul;27(21):3459-3464.

Sun GG, Wang YD, Lu YF, Hu WN. Different association of manganese superoxide dismutase gene polymorphisms with risk of prostate, esophageal, and lung cancers: evidence from a meta-analysis of 20,025 subjects. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(3): 1937-1943.

Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 2003; 13(3): 145-157.

Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. Protein Carbonylation. *Antioxid Redox Sign.* 2010 Mar;12(3):323–325.

Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, *et al.* A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem.* 2002 Oct; 277(43): 41254–41258.

Tao ZQ, Shi AM, Wang KX, Zhang WD. Epidemiology of prostate cancer: current status. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19 (5): 805-812.

Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, *et al.* Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005; 60(4): 145-157.

Thomas R, Sharifi N. SOD mimetics: a novel class of androgen receptor inhibitors that suppresses castration-resistant growth of prostate cancer. *Mol Cancer Ther*. 2012 Jan;11(1):87-97.

Troen BR. The biology of aging. *Mt Sinai J Med*. 2003 Jan;70(1):3-22.

True L, Coleman I, Hawley S, Huang CY, Gifford D, Coleman R, *et al.* A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul;103(29):10991-10996.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007 Aug;39(1):44-84.

Van LGF, Tabatabaie P, Kucinskas V, Saha N, Beckman G. Ethnic variation in the mitochondrial targeting sequence polymorphism of MnSOD. *Hum Hered* 1999 Jul;49(4):190-193.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71.

Victor VM, Apostolova N, Herance R, Hernandez-Mijares A, Rocha M. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. *Curr Med Chem*. 2009;16(35):4654-4667.

Vida OÁ, Pricop C, Loghin A, Chiuțu LC, Mártha O. The place of prostate rebiopsy in the diagnosis of prostate cancer. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55(3):1161-6.

Wang S, Wang F, Shi X, Dai J, Peng Y, Guo X, *et al.* Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk - A meta-analysis. *Eur J Cancer* 2009; 45(16): 2874-2881.

Wang Y, Cui R, Xiao Y, Fang J, Xu Q. Effect of Carotene and Lycopene on the Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS One*. 2015 Sep; 10(9): e0137427.

Warnholtz A, Wendt M, August M, Münzel T. Clinical aspects of reactive oxygen and nitrogen species. *Biochem Soc Symp*. 2004; (71): 121-133.

Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem*. 1973Jul;248(13):4793-4796.

Wigle DT, Turner MC, Gomes J, Parent ME. Role of hormonal and other factors in human prostate cancer. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2008 Mar;11(3-4):242-259.

Williams H, Powell IJ. Epidemiology, pathology, and genetics of prostate cancer among African Americans compared with other ethnicities. *Methods Mol Biol.* 2009;472: 439–453.

Wispé JR, Clark JC, Burhans MS, Kropp KE, Korfhagen TR, Whitsett JA. Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta.* 1989 Jan; 994(1):30-36.

Yin M, Bastacky S, Chandran U, Becich MJ, Dhir R. Prevalence of incidental prostate cancer in the general population: a study of healthy organ donors. *J Urol.* 2008 Mar;179(3):892-5.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002 Aug;33(3): 337-349.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o polimorfismo da SOD2 na agressividade do câncer de próstata por meio de dois protocolos (*in vivo* e *in vitro*) combinados.

2.2. Objetivos específicos

- Protocolo *in vivo* - associação do polimorfismo SNP Ala16Val-SOD2 com a agressividade do câncer de próstata no momento do diagnóstico.
- Protocolo *in vitro*- 2. Avaliar o efeito farmacológico no desbalanço da superóxido-peróxido de hidrogênio em linhagem tumoral DU-145 de câncer de próstata.

3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

O artigo intitulado, *The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis*, encontra-se no ANEXO, de acordo com as normas de publicação da revista *Medical Oncology*.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados mostraram que portadores do alelo-V do polimorfismo Ala16Val-SOD2 demonstram maior agressividade tumoral, pois estes, apresentaram uma classificação de Gleason >7 quando comparados com os do alelo-A. Já que, quanto maior for a classificação de Gleason pior é o prognóstico.

Também observamos, apesar das limitações, que a porfirina (mimética do peróxido de hidrogênio-AA) conseguiu diminuir a proliferação celular e consequentemente inibir significativamente o ciclo celular na fase S. Já o paraquat (mimético do radical superóxido-VV) não causou nenhuma alteração significativa. Esses resultados *in vitro* corroboram com nossos resultados *in vivo*. Pois, de acordo com o nosso estudo farmacológico o radical superóxido (VV) se mostrou mais agressivo, já que não teve a capacidade de diminuir a proliferação nem inibir o ciclo celular.

Portanto, nossos resultados combinados confirmam a relevância do desequilíbrio do superóxido-peróxido de hidrogênio em biologia celular no câncer de próstata e apoia sugestões anteriores que a alteração do estado redox pode ser explorada terapêuticamente no tratamento desta neoplasia.

5. ANEXO

5.1. Artigo publicado na revista Medical Oncology

Med Oncol (2015)32:251
DOI 10.1007/s12032-015-0700-1



ORIGINAL PAPER

The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis

Maiquidieli Dal Berto¹ · Claudia Giuliano Bica¹ · Gustavo Pereira de Sá² ·
Fernanda Barbisan² · Verônica Farina Azzolin² · Felipe Rogalski³ ·
Marta Maria Medeiros Frescura Duarte² · Ivana Beatrice Mânica da Cruz²

Received: 30 September 2015 / Accepted: 7 October 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract The epidemiological impact of SOD2 imbalance on prostate cancer (PC) risk associated with genetic variations has previously been studied. However, we found no previous studies clarifying the nature of SOD2 effects on prostate cancer. Here, we performed integrated in vivo and in vitro protocols that analyzed the association between Ala16Val-SOD2 polymorphism and prostate cancer aggressiveness at the time of diagnosis and evaluated the effect of the imbalance on PC proliferation using the DU-145 PC cell line treated with paraquat and porphyrin. In the pharmacological model, paraquat was used to increase superoxide anion levels and porphyrin was the SOD2 analog. The results confirmed the impact of superoxide–hydrogen peroxide imbalance on PC cell biology since porphyrin decreased cell proliferation and both treatments modulated antioxidant genes. Therefore, our results corroborate previous suggestions that alteration of redox status could be exploited therapeutically in the treatment of PC.

Keywords DU-145 · Genotypes · Paraquat · Porphyrin · Prostate cancer · Superoxide manganese dependent

Introduction

Prostate cancer development and aggression have been associated with an increase in oxidative stress due to an imbalance in reactive oxygen species (ROS) [1, 2]. The cellular control of ROS involves several mechanisms including an antioxidant system that initially dismutates superoxide anion into hydrogen peroxide via superoxide dismutase (SOD) and catalyzes hydrogen peroxidase into water via catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX). Furthermore, superoxide dismutase enzyme manganese-dependent (MnSOD or SOD2) dysfunction was associated with risk of prostate cancer development as well as metastasis [3].

A nuclear gene produces this enzyme, which only acts in mitochondria [4]. Understanding the roles of SOD2 in cancer etiology has been approached by means of in vivo and in vitro cancer risk and cancer progression studies [5–7]. Although SOD2 has been considered a tumor suppressor protein that regulates cell death events under certain circumstances, a chronic increase in SOD2 levels can trigger DNA damage due to overproduction of hydrogen peroxide [8].

The epidemiological impact of SOD2 imbalance on cancer prostate risk associated with genetic variations has previously been studied. A single nucleotide polymorphism (SNP) resulting in a structural mutation that replaces a thymine (T) with a cytosine (C) is the most common genetic variation found in the SOD2 gene (rs4880). This nucleotide change results in the substitution of valine by alanine in codon 16, changing the valine amino acid (GTT)

Maiquidieli Dal Berto and Gustavo Pereira de Sá are co-senior authors.

✉ Claudia Giuliano Bica
claudia@ufcspa.edu.br

¹ Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

² Department of Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria 97105900, Brazil

³ Cellular Genetics Laboratory, Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, Minami-Osawa, Hachioji-shi, Tokyo 192-0397, Japan

The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis

Maiquideli Dal Berto¹ · Claudia Giuliano Bica¹ · Gustavo Pereira de Sá² ·
Fernanda Barbisan² · Verônica Farina Azzolin² · Felipe Rogalski³ ·
Marta Maria Medeiros Frescura Duarte² · Ivana Beatrice Mânica da Cruz²

Received: 30 September 2015 / Accepted: 7 October 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract The epidemiological impact of SOD2 imbalance on prostate cancer (PC) risk associated with genetic variations has previously been studied. However, we found no previous studies clarifying the nature of SOD2 effects on prostate cancer. Here, we performed integrated in vivo and in vitro protocols that analyzed the association between Ala16Val-SOD2 polymorphism and prostate cancer aggressiveness at the time of diagnosis and evaluated the effect of the imbalance on PC proliferation using the DU-145 PC cell line treated with paraquat and porphyrin. In the pharmacological model, paraquat was used to increase superoxide anion levels and porphyrin was the SOD2 analog. The results confirmed the impact of superoxide–hydrogen peroxide imbalance on PC cell biology since porphyrin decreased cell proliferation and both treatments modulated antioxidant genes. Therefore, our results corroborate previous suggestions that alteration of redox status could be exploited therapeutically in the treatment of PC.

Keywords DU-145 · Genotypes · Paraquat · Porphyrin · Prostate cancer · Superoxide manganese dependent

Introduction

Prostate cancer development and aggression have been associated with an increase in oxidative stress due to an imbalance in reactive oxygen species (ROS) [1, 2]. The cellular control of ROS involves several mechanisms including an antioxidant system that initially dismutates superoxide anion into hydrogen peroxide via superoxide dismutase (SOD) and catalyzes hydrogen peroxidase into water via catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX). Furthermore, superoxide dismutase enzyme manganese-dependent (MnSOD or SOD2) dysfunction was associated with risk of prostate cancer development as well as metastasis [3].

A nuclear gene produces this enzyme, which only acts in mitochondria [4]. Understanding the roles of SOD2 in cancer etiology has been approached by means of in vivo and in vitro cancer risk and cancer progression studies [5–7]. Although SOD2 has been considered a tumor suppressor protein that regulates cell death events under certain circumstances, a chronic increase in SOD2 levels can trigger DNA damage due to overproduction of hydrogen peroxide [8].

The epidemiological impact of SOD2 imbalance on cancer prostate risk associated with genetic variations has previously been studied. A single nucleotide polymorphism (SNP) resulting in a structural mutation that replaces a thymine (T) with a cytosine (C) is the most common genetic variation found in the SOD2 gene (rs4880). This nucleotide change results in the substitution of valine by alanine in codon 16, changing the valine amino acid (GTT)

Maiquideli Dal Berto and Gustavo Pereira de Sá are co-senior authors.

✉ Claudia Giuliano Bica
claudia@ufcsa.edu.br

¹ Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

² Department of Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria 97105900, Brazil

³ Cellular Genetics Laboratory, Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, Minami-Osawa, Hachioji-shi, Tokyo 192-0397, Japan

into alanine (GCT) [9, 10]. The polymorphism produces three possible genotypes: AA, VV and AV. The SOD2 protein produced by the V-allele has a β -sheet secondary structure, whereas the A-allele produces an α -helix protein structure. The A-SOD2 protein is able to quickly transverse mitochondrial membranes, whereas V-SOD2 is partially arrested in these membranes. An investigation performed by Sutton et al. [10] showed that A-SOD2 precursors generate 30–40 % more of the active, matricial, processed SOD2 homotetramer than V-SOD2 precursors.

Several studies have suggested that the A-allele or genotype represents an increased risk of prostate cancer development [11–14], whereas other studies found no association. The potential influence of the Ala16Val-SOD2 polymorphism on prostate cancer aggressiveness is also controversial. A review performed by Bresciani et al. [8] suggested that the conflicting data may be due to intervening environmental or ethnic variables that influence the prostate risk of this polymorphism [15].

A recent investigation performed by Margalit et al. [16] suggested an association between three SOD2 polymorphisms (rs6917589; rs2758331 and rs4880) and death from prostate cancer or distant metastasis. However, other studies such as that performed by Duan et al. [17] suggest that SOD2 has an important tumor suppressor role in prostate cancer and could be used as genetic therapy in the treatment of human prostate cancer. Despite the above, there has been no integrated in vivo and in vitro study to clarify the effect of SOD2 on prostate cancer. Therefore, we performed an integrated investigation that initially analyzed the potential in vivo association between the Ala16Val-SOD2 polymorphism and prostate cancer aggressiveness at the time of diagnosis. A second in vitro study was performed to investigate the impact of SOD2 imbalance on prostate cancer proliferation using the DU-145 prostate cancer cell line, which was cultured under a superoxide anion–hydrogen peroxide imbalance in order to create some similarity potentially observed in AA and VV-SOD2 genotypes. This involved developing a pharmacological in vitro model using paraquat and porphyrin treatment. Paraquat is an organic compound that interferes with electron transfer by reduction of electron donors such as NADPH in the mitochondria, thus increasing superoxide anion levels [18], and porphyrin is a SOD2 mimic [19].

Materials and methods

In vivo analysis

Initially we conducted a case–control study that evaluated the association between Ala16Val-SOD2 polymorphism and prostate cancer. A total of 305 subjects (249 healthy

controls and 56 patients) were selected from São Lucas Hospital, Porto Alegre, Brazil. All patients were ≥ 50 years old and Caucasians. The inclusion criteria included patients with a pathological diagnosis of prostatic adenocarcinoma. Other types of neoplasia were excluded, as well as dysfunction that could influence the results. Prostate cancer was classified by stage using the American Joint Committee on Cancer tumor–nodes–metastasis (TNM) staging manual [20] and by grade using Gleason score at diagnosis. ‘Early stage’ cases were those that were apparently organ confined with no involvement of the seminal vesicle (T1 or T2 or T3a and N0M0 stage), whereas ‘advanced-stage’ cases were those with local spread to the seminal vesicle and beyond (T3c or T4 and N0M0, any T and N (1–3) or any T and M1 stage). Tumors with Gleason score < 7 were classified as ‘well to moderately well differentiated,’ whereas those with a Gleason score ≥ 7 were classified as ‘poorly differentiated.’ Finally, tumor aggressiveness was defined based on a combination of stage and Gleason grade: Apparently organ-confined tumors or those with a Gleason score < 7 were defined as ‘less aggressive’; tumors with advanced stage or Gleason score ≥ 7 were defined as ‘more aggressive.’ The Gleason stages were compared among subjects with different Ala16Val-SOD2 genotypes. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committees of all relevant institutions, and informed consent was obtained from all individuals whose information was collected prospectively.

Ala16Val-SOD2 polymorphism genotyping

Blood samples were collected from subjects by venipuncture, and Ala16Val-SOD2 genotyping was determined by polymerase chain reaction using a direct total blood cell sample and Tetra-Primer ARMS-PCR assay as described by Barbisan et al. [21] with slight modifications. Briefly, two primer pairs were used to amplify and determine the genotype of a DNA fragment containing the Ala16Val SNP in the human SOD2 sequence. The 3'-end of the allele-specific primers is underlined F1 (forward) 5'-CACCAGCACTAGCAGCATGT-3'; F2 (forward) 5'-GCAGGCAGCTGGCT_aCGGT-3'; R1 (reverse) 5'-ACGCCTCCTGGTACTTCTCC-3'; R2 (reverse) 5'-CCTGGAGCCCAGATAACCC_tAAAG-3'. Underlined lowercase bases indicate the introduced mismatches. The PCR reaction was carried out in a total volume of 40 μ L containing 20–40 ng of genomic DNA as the template, 0.5 μ M of each primer, 100 μ M of each dNTP, 1.25 mM of $MgCl_2$, PCR buffer (20 mM Tris–HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 5 % dimethyl sulfoxide (DMSO), and 1.25 units of DNA polymerase. The PCR amplification was carried out with an initial denaturation at 94 °C for 7 min, followed by 35 cycles of 60 s of denaturation at 94 °C, 20 s of annealing at 60 °C, and 30 s of extension at 72 °C, and an additional 7 min

of extension at 72 °C at the end of the final cycle. A 20- μ L aliquot of the PCR product was mixed with 2 μ L of loading buffer and resolved by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel. This procedure resulted in three bands in heterozygotes (514, 366, and 189 bp) and two bands in homozygotes (Val/Val resulting in bands of 514 and 189 bp, and Ala/Ala resulting in bands of 514 and 366 bp).

In vitro protocol

Since the superoxide–hydrogen peroxide balance can be influenced by several environmental factors, an in vitro protocol was designed to test the effect of superoxide–hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer cell proliferation. To perform this protocol, the DU-145 prostate cancer cell line was exposed to paraquat, which generates high levels of superoxide anion, and porphyrin, which mimics the SOD2 enzyme. As these molecules are cytotoxic depending on their concentrations, their effect on prostate cancer viability was initially determined using several concentrations of paraquat and porphyrin. Based on the results obtained, the concentrations of paraquat and porphyrin that positively modulated the cancer cells by increasing their viability when compared to the control group were used to test the effect on cell proliferation. To confirm that these concentrations caused oxidative imbalance in prostate cancer cells, we performed complementary assays that evaluated the levels of ROS, protein carbonylation, lipoperoxidation, and DNA damage.

Cell culture conditions

The DU 145 human prostate adenocarcinoma cell line was purchased from the American Type Culture Collection (Bethesda, MD). Cells were grown as monolayers in DMEM with 10 % fetal bovine serum and 1 % penicillin/streptomycin and amphotericin B. The cells were cultured at 37 °C with 5 % CO₂ and were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments. Culture tubes for each subject were prepared at a final concentration of 1×10^5 cells/mL. After cell attachment, the cultures were treated with paraquat and porphyrin. The cells were then incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂ for 6, 24 and 72 h for the assays.

Cell viability and proliferation assays

Cell viability after 24-h exposure to paraquat and porphyrin and cell proliferation after 72 h of exposure were analyzed by the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay as described by Barbisan et al. [21]. Briefly, treated cells were incubated for 1 h with MTT reagent at 37 °C. After dissolving the

formazan salt in DMSO (dimethyl sulfoxide), the absorbance was measured at 560 nm. The MTT assay was performed using a 96-well plate in three independent replications. One complementary analysis was performed to confirm the effect of paraquat and porphyrin on cell viability: quantification of free double-stranded DNA (dsDNA) picogreen as described by Cadoná et al. [23]. The results were expressed as a percentage of the untreated control values.

Oxidative assays

In order to confirm that porphyrin and paraquat at non-lethal concentrations cause changes in the oxidative and antioxidative status of cancer cells after 6-h exposure, we analyzed the followed variables: superoxide, nitric oxide, ROS and lipoperoxidation by spectrophotometry and fluorimetry; quantification of DNA damage by determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG); and antioxidant enzyme levels (SOD1, SOD2, catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) using competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Superoxide levels were measured according to Spitz and Oberley [24], and this methodology was used to evaluate the antioxidant activity of SOD and its isoforms. It is based on indirect measurement of the SOD activity involving competition between the enzyme and an indicator substance for superoxide radicals (O₂⁻), NBT (nitro blue tetrazolium). This evaluation uses xanthine oxidase and a superoxide source, which reduces the NBT to formazan blue. Thus the higher the SOD activity in the tissue or sample analyzed, the lower the absorbance, i.e., less NBT is reduced by the superoxide formed. Nitric oxide levels were determined according to Choi et al. [25]. The ROS level was determined using the non-fluorescent cell permeating compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. In this technique, the DCFDA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants. After the designated treatment time, the cells were treated with DCFDA (10 μ M) for 60 min at 37 °C. In the assay, 1×10^5 cells from each sample were used to measure ROS levels [15]. The fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm, and the results were expressed as picomoles/mL of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) produced from 2',7'-dichlorofluorescein in reaction with ROS molecules present in the samples. Lipoperoxidation was determined by quantification of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to the modified method of Jentzsch et al. [26]. The carbonylation of serum proteins was determined by the Levine et al. [27] method with modifications. Quantification of

8-oxo-dG was performed using an ELISA kit (Oxis Health Products Inc., Portland-OR, USA) following the manufacturer's instructions. Quantification was performed in a 96-well microplate, using a standard curve made by plotting absorbance versus log of concentration read at 450 nm. Antioxidant enzymes were determined by ELISA using kits produced by ABCAN (Cambridge, UK), following the manufacturer's instructions. Test sensitivity and absorbance readings were as follows: SOD1 = 0.1 ng/ml, 600 nm; SOD2 = 4 ng/ml, 600 nm; CAT = 4 ng/ml, 450 nm; and GPX = 0.5 mU/ml, 340 nm.

Cell cycle analysis by flow cytometry

To confirm the effect of paraquat and porphyrin on prostate cancer cell proliferation, an analysis of cell cycle after 72 h exposure was performed by flow cytometry using propidium iodide (PI) dye. The cell cycle analysis [28] was performed using flow cytometry after 72 h of DU145 treatment with paraquat and porphyrin. The PI reagent binds to DNA by intercalating between the bases with little or no sequence preference. PI also binds to RNA, necessitating treatment with nucleases to distinguish between RNA and DNA staining. Cells were seeded in 24-well plates at 1×10^5 cells per well in 2 mL of the different treatments in DMEM and incubated for 72 h. Following incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS, and resuspended in 70 % ethanol (by vortexing) at -20°C overnight. Prior to analysis, the cells were centrifuged and washed once with PBS, after which the cells were resuspended in 500 μl PI-solution in PBS (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI from $50\times$ stock solution (2.5 mg/ml), 0.1 mg/ml RNase A, 0.05 % Triton X-100), and incubated for 40 min at 37°C . Finally, 3 ml of PBS was added for washing and the cells were then resuspended in 500 μl PBS for flow analysis.

mRNA expression analysis by quantitative QT-PCR assay of genes

The effect of paraquat and porphyrin on antioxidant enzyme genes (SOD1, SOD2, CAT and GPX) as well as four genes related to cell proliferative modulation (Bcl-2, BAX, Caspase 3, and Caspase 8) were analyzed by QT-PCR assay as previously described in Barbisan et al. [21]. Total RNA was isolated using TRIzol reagent. RNA yields were measured using a Nanodrop 2000 spectrophotometer. First-strand cDNA was synthesized from total RNA (2 μg) using a First-Strand cDNA Synthesis Kit and oligo dT primers. Q-PCR was performed in a 20- μl reaction that contained 1 μl of the cDNA and 12.5 μL of 2X QuantiFastSYBR Green PCR Master Mix, 3.9 μL of Rnase-free water, and 1 μM of the primers, and the following PCR parameters: PCR initial activation step 95°C for 5 min

followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s followed by a melt curve of $60\text{--}90^\circ\text{C}$ in 0.5°C increments for 5 s. The expression level of beta-actin was used as an internal control. The relative expression was calculated using the comparative Ct and was expressed as the fold expression compared to the control. The specific primer pairs for the antioxidant enzyme genes used in this study were:

SOD1 = forward GCACACTGGTGGTCCATGAA and reverse ACACCACAAGCCAAACGACTT; SOD2 = forward GCCCTGGAACCTCACATCAA and reverse GGTA CTTCTCCTCGGTGACGTT; CAT = forward GATAGC CTTCGACCCAAGCA and reverse ATGGCGGTGAGTG TCAGGAT; GPX = forward GGTTTTTCATCTATGAGG GTGTTTCC and reverse GCCTTGGTCTGGCAGAGAC T; BAX = forward CCCTTTTCTACTTTGCCAGCAA and reverse CCCGGAGGAAGTCCAATGT; Bcl-2 = forward GAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT; reverse AGT-CATCCACAGGGCGATGT; CASP3 = forward TTTGAG CCTGAGCAGAGACATG and reverse TACCAGT GCGT ATGGAGAAATGG; CASP 8 = forward AGGAGCTGCT CTCCGAATT and reverse CCCTGCCTGGTGTCTGAA GT.

Statistical analysis

Statistical software (SPSS 11.0, Chicago, USA) was used to analyze the in vivo data. Student's t test was used to compare quantitative baseline variables between case and control subjects. The allele frequencies were estimated by the gene-counting method. Chi-square (χ^2) analysis was used to estimate the Hardy-Weinberg equilibrium. The allelic and genotype frequencies as well as the frequency of Gleason levels were compared among groups using Chi-square or the Fisher's exact test. In the in vitro protocols, the statistical analyses were carried out using Graph Pad Prism 5 software, and the results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Comparison of all groups was performed using two-way analysis of variance followed by post hoc Tukey's or Dunnet's tests. All *p* values were two-tailed. The alpha value was set to <0.05 , indicating statistical relevance.

Results

Characteristic baselines and Ala16Val-SOD2 genotype frequencies are shown in Table 1. Mean age was similar in the control and prostate cancer groups, and as expected PSA values were higher in prostate cancer subjects. The genetic frequencies of Ala16Val-SOD2 polymorphism were in Hardy-Weinberg equilibrium. Allele frequencies were $A = 0.804$ and $V = 0.196$ in the control group and

Table 1 Baseline characteristics and Ala16Val-SOD2 genetic frequencies of controls and prostate cancer subjects

Variables	Controls	Prostate cancer	<i>p</i> *
Age (years, mean ± SD)	64.27 ± 7.79	66.47 ± 7.75	0.12
PSA levels (ng/dL, mean ± SD)	1.76 ± 1.34	21.54 ± 45.99	0.03
Genotype <i>n</i> (%)			
AA	18 (7.2)	13 (18.6)	0.01
VV	66 (26.8)	15 (21.4)	
AV	165 (66.0)	28 (60.0)	

* SD standard deviation; * statistical test: Chi square, as considered significant $p \leq 0.05$

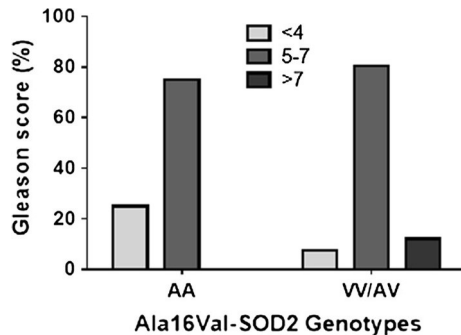


Fig. 1 Gleason score comparison between AA and V-carriers of Ala16Val-SOD2 polymorphism affected by prostate cancer

$A = 0.771$ and $V = 0.228$ in the prostate cancer group. Comparison between genotypes showed a higher frequency of the AA allele in prostate cancer subjects when compared to control subjects.

However, when tumoral aggressiveness at the time of diagnosis was evaluated, V-carriers presented higher Gleason scores than AA subjects (Fig. 1). Twelve percent of VV patients and 10 % of AV patients presented higher Gleason scores (>7), whereas no AA patients presented higher Gleason scores ($p = 0.02$).

A second approach described in the present investigation evaluated the effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance in the DU-145 prostate cancer cell line caused by exposure to a range of concentrations of paraquat and porphyrin (Fig. 2).

Lower paraquat doses significantly increased cell viability when compared to the control group, whereas doses $\geq 1 \mu\text{M}$ caused extensive mortality after 24 h exposure. In contrast, porphyrin was not toxic to prostate cancer cells, but increased cell viability when compared to the control group at $100 \mu\text{M}$. For this reason, the effect of paraquat and porphyrin on cancer cell proliferation was tested at ≥ 0.1 and $\geq 100 \mu\text{M}$, respectively, since these concentrations increased viability by around 1 % in relation to the control group.

The expression of four genes associated with the triggering of apoptosis was also analyzed, and the results are shown in Fig. 3. Porphyrin treatment upregulated all genes

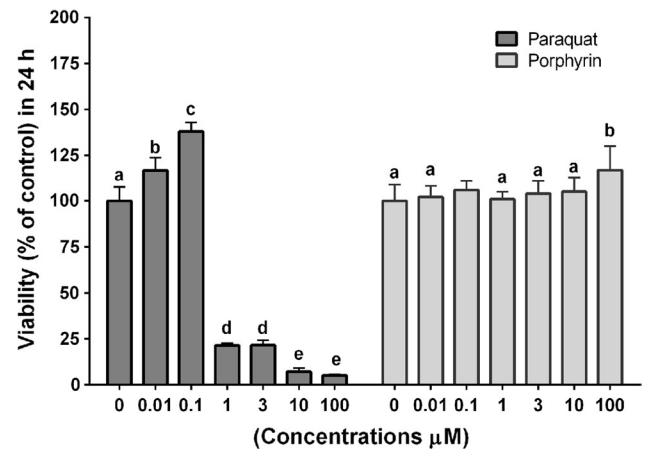


Fig. 2 Effect of paraquat and porphyrin on viability of DU-145 prostate cancer cells. The data are presented as % of untreated control group. Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Tukey's test. Different letters indicate statistical differences at $p \leq 0.05$

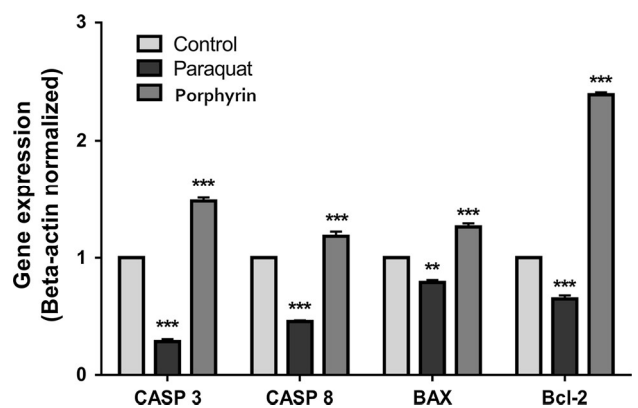


Fig. 3 Comparison of expression of four genes associated with apoptosis pathway among control and treated (paraquat, $0.1 \mu\text{M}$; porphyrin, $100 \mu\text{M}$) DU-145 prostate cancer cells after 6-h exposure. Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Dunnet's test. Statistical differences $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$

evaluated, including the anti-apoptotic Bcl-2 gene. The opposite was observed in cells exposed to paraquat, with the downregulation of all genes tested.

Oxidative variables evaluated in cells exposed to 0.1 μM paraquat and 100 μM porphyrin confirmed that these concentrations caused an imbalance in the oxidative status of prostate cancer cells (Fig. 4). Both treatments significantly increased superoxide levels when compared to the control group ($p = 0.01$), but only paraquat caused a decrease in nitric oxide levels ($p = 0.01$). ROS levels and dsDNA levels did not differ from the control group. However, protein carbonylation and DNA damage were higher in the paraquat-treated cells followed by porphyrin-treated cells when compared to levels found in untreated prostate cancer cells.

Treatments also significantly reduced the activity of antioxidant enzymes when compared to untreated prostate cancer cells. This effect was stronger in cells treated with porphyrin than with paraquat. A complementary analysis showed that both treatments trigger the modulation of gene expression of these enzymes (Fig. 5).

Both treatments caused differential antioxidant gene modulation. Porphyrin induced SOD1, SOD2, and CAT upregulation as well as downregulation of GPX. On the other hand, paraquat had no effect on SOD1 gene expression, but induced significant downregulation of other antioxidant enzyme genes.

Given these results, the effect of oxidative imbalance on prostate cancer cell proliferation was evaluated after 72 h exposure. Porphyrin at 100 μM significantly decreased cell proliferation ($p = 0.001$) when compared to the control group. However, this effect was not observed in cells treated with ≥ 0.1 μM paraquat (Fig. 6). The cell cycle was analyzed by flow cytometry, showing that porphyrin treatment caused a significant increase in cells in the S/M cycle phases when compared to the control group ($p = 0.02$). The number of cells marked by PI was lower in porphyrin-treated cells when compared to the control group. This effect was not observed in cells treated with paraquat.

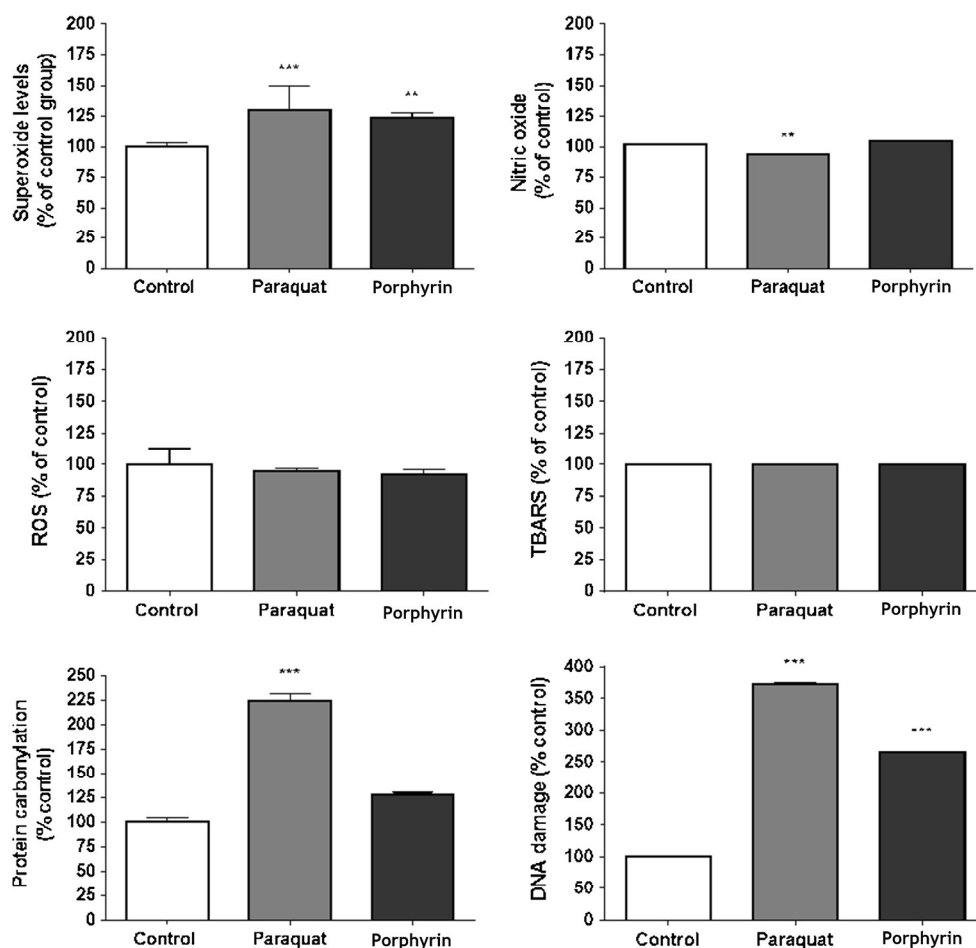
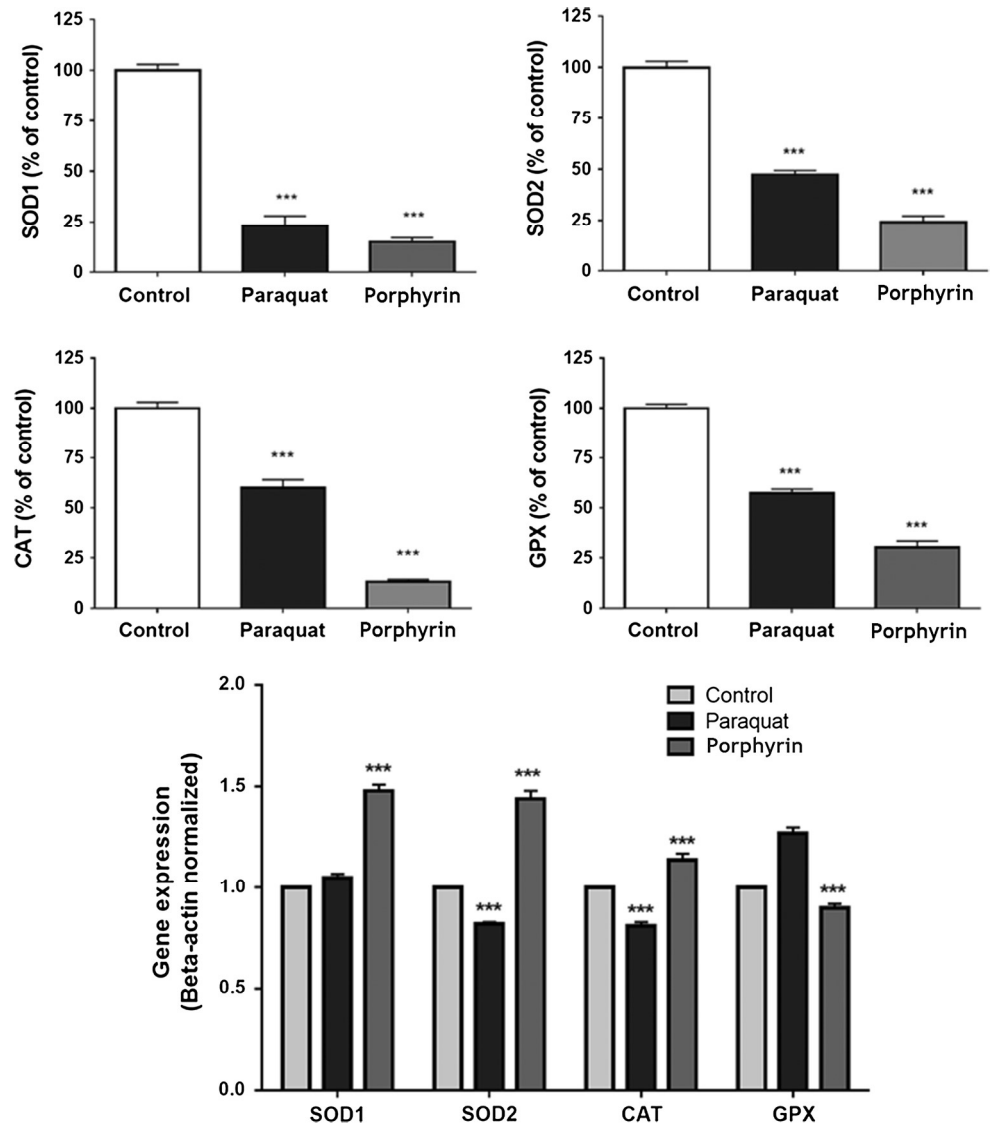


Fig. 4 Comparison of oxidative variables in control and treated (paraquat, 0.1 μM ; porphyrin, 100 μM) DU-145 prostate cancer cells after 6-h exposure. The data are presented as % of untreated control

group. Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Dunnet's test. Statistical differences $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$

Fig. 5 Comparison of antioxidant enzyme activity and gene expression in control and treated (paraquat, 0.1 μM; porphyrin, 100 μM) DU-145 prostate cancer cells after 6-h exposure. The data are presented as % of untreated control group. Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Dunnet’s test. Statistical differences ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$



Discussion

In the present investigation, we investigated whether the superoxide anion–hydrogen peroxide imbalance associated with Ala16Val-SOD2 SNP could be associated with prostate cancer using two integrated approaches. In the first analysis, we found an association between a higher risk of prostate cancer and the AA genotype. However, a second analysis showed an association with V-allele carriers and aggressive prostate cancer at the time of diagnosis. These two results suggest a dual role of SOD2 modulation in cancer biology, corroborating a previous investigation performed by Bica et al. [12] that described an association between AA and breast cancer risk and VV and cancer aggressiveness.

Some meta-analyses have suggested that the association between prostate cancer and Ala16Val-SOD2 is

controversial: As some studies have found an association between prostate cancer and Ala16Val-SOD2 SNP [13–29], whereas others have not [30]. On the other hand, when we analyzed the aggressiveness of prostate cancer at diagnosis, we found that carriers of V-alleles (VV and AV genotypes) presented higher Gleason scores than AA patients. Ergen et al. [31] investigated Turkish patients and found an association between the AA genotype and risk of prostate cancer, but no association between aggressive prostate cancer determined by the Gleason score and Ala16Val-SOD2 SNP.

These contradictory data may be due to the strong influence of environmental factors such as nutrition and physical activity as well as ethnic origin, as described in a review performed by Bresciani et al. [8]. For example, the investigation performed by Mikhak et al. [32] found no general association between this polymorphism and aggressive prostate cancer risk. However, male carriers’ of

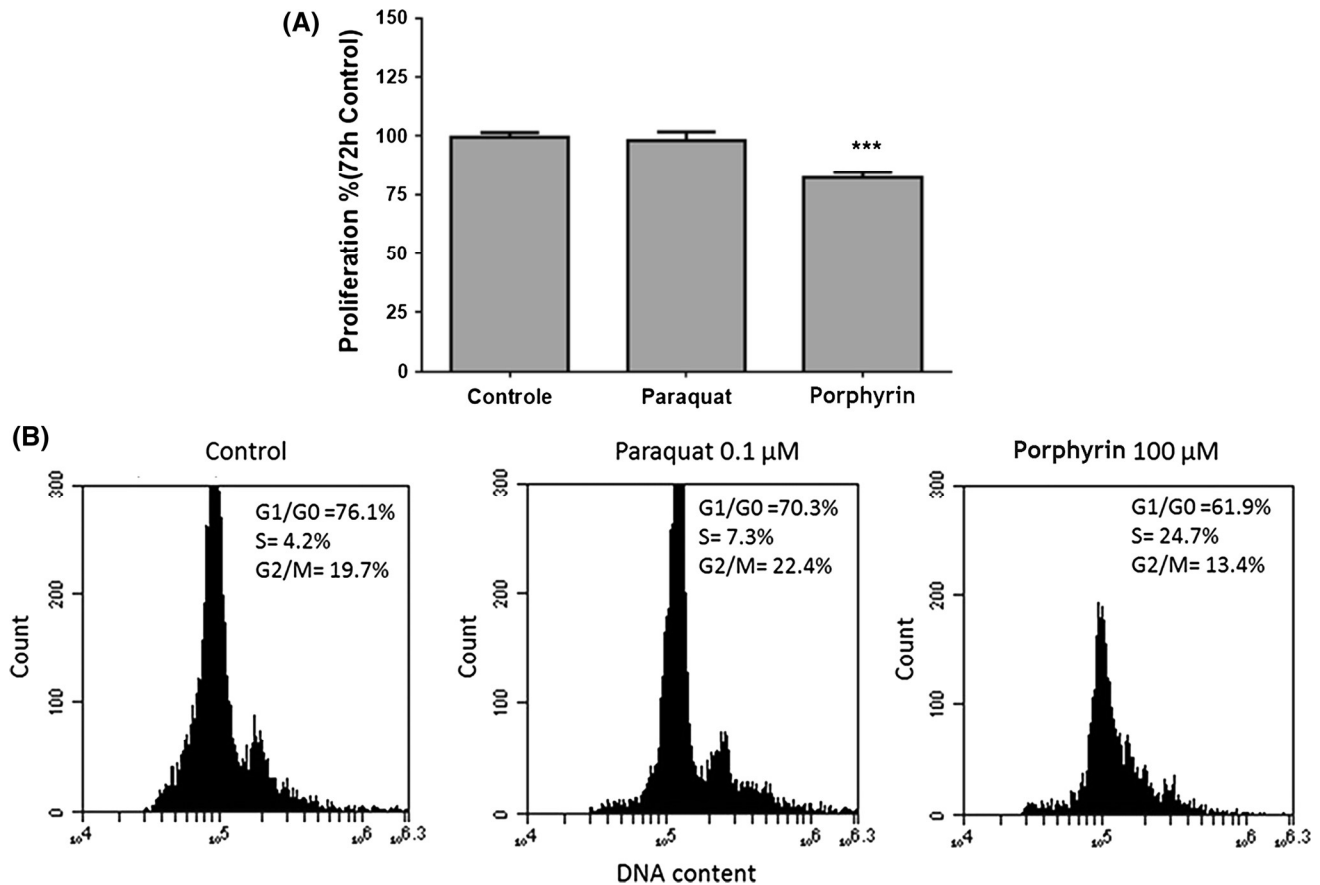


Fig. 6 Cellular proliferation (a) and representative results of cell cycle analyzed by flow cytometry (b) with propidium iodide after 72-h exposure to paraquat (0.1 μM) and porphyrin (100 μM). The median frequencies are presented for the main parts of the cell cycle

the AA genotype who had low long-term lycopene status presented higher aggressive prostate cancer risk than men who habitually consumed vegetables rich in antioxidant molecules.

Although we found no direct association between differential modulation of SOD2 related to genetic polymorphism and prostate cancer, we consider that investigating the role of SOD2 in prostate cancer is very important because it may be related to the prognosis and therapeutic management of this cancer. This premise is based on the well-known role of oxidative metabolism in carcinogenesis during tumor initiation, neoangiogenesis, and cell proliferation, which several studies have indicated involves alterations in SOD2 enzyme activity [5].

However, due to its high sensitivity to environmental and genetic variables, it is difficult to estimate the actual impact of SOD2 imbalance on prostate cancer cells. For this reason, we developed an *in vitro* experimental assay that investigated the role of SOD2 imbalance (pharmacologically caused by exposure to paraquat and porphyrin) in DU-145 cells, a prostate cancer cell line. Despite the methodological limitations potentially associated with the

in vitro protocol and with the drugs used as the superoxide anion donor and to increase the concentration of SOD2 activity, our results suggested that SOD2 imbalance influences prostate cancer cell proliferation. The reduction in cancer cell proliferation caused by porphyrin exposure (which generated a cellular environment with higher SOD2 activity than in the control group) was more intense than that caused by paraquat. Cytometry flow analysis confirmed that porphyrin was able to inhibit the cell cycle mainly in the S phase, when compared to the control group.

Although previous studies have shown the role of SOD2 in cancer [5–7, 33], to the best of our knowledge, our investigation is the first to show the relevance of SOD2 imbalance in cancer risk and progression using concomitant *in vivo* and *in vitro* approaches.

The role of SOD2 in prostate cancer appears to be complex and is linked with other molecules related to cellular oxidative status. This premise is based on a recent investigation that showed discordant levels of antioxidant proteins and their enzymatic activities in prostate cancer tissues that probably contribute to the redox imbalance observed during prostate cancer progression [33]. In terms

of SOD2, the authors reported that whereas SOD2 enzyme activity was significantly increased in cancer prostate tissues with higher Gleason scores, the protein levels were lower. This discordance in the SOD2 protein/enzyme levels could be due to inactivation of SOD2 protein or post-translational modifications of tyrosine and lysine by nitration or by gene methylation. Among the proposed mechanisms for how alterations in intra- and extra-cellular redox states can induce prostate cancer progression, Chaiswing et al. [3] suggested that in high-grade cancer the SOD2 becomes non-functional and the increase in superoxide levels induces cancer progression. However, they did not explore the possible effect of superoxide imbalance on prostate cancer progression due to modulation of antioxidant gene expression. We analyzed this issue here, observing that when paraquat was added to prostate cancer cell cultures the SOD2 and CAT genes were downregulated, whereas the GPX gene was upregulated. In contrast, porphyrin upregulated all antioxidant genes with the exception of GPX. Despite this differential gene regulation, only porphyrin decreased prostate cancer cell proliferation, and paraquat did not alter this important parameter.

The combined results confirm the relevance of superoxide–hydrogen peroxide imbalance in prostate cancer cell biology and support previous suggestions that alteration of redox status could be exploited therapeutically in the treatment of prostate cancer. Nutritional supplementation during or after prostate cancer treatment cannot be ruled out and should be investigated in pre-clinical and clinical studies.

Acknowledgments The authors are grateful for the help of the Laboratory of Biogenômica—Federal University of Santa Maria, RS, Brazil. This study was funded by the following research grants and fellowships: CNPq and CAPES.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest including any financial, personal, or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence, or be perceived to influence, the present work.

References

- Oberley TD, Zhong W, Szweda LI, Oberley LW. Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium. *Prostate*. 2000;44(2):144–55.
- Chaiswing L, Bourdeau-Heller JM, Zhong W, Oberley TD. Characterization of redox state of two human prostate carcinoma cell lines with different degrees of aggressiveness. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(2):202–15.
- Chaiswing L, Zhong W, Oberley TD. Increasing discordant antioxidant protein levels and enzymatic activities contribute to increasing redox imbalance observed during human prostate cancer progression. *Free Radic Biol Med*. 2014;67:342–52.
- Bresciani G, da Cruz IB, González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv Clin Chem*. 2015;68:87–130.
- Oberley LW. Anticancer therapy by overexpression of superoxide dismutase. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3(3):461–72.
- Pani G, Colavitti R, Bedogni B, Fusco S, Ferraro D, Borrello S. Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies. *Curr Med Chem*. 2004;11(10):1299–308.
- Oberley LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother*. 2005;59(4):143–8.
- Bresciani G, Cruz IB, de Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res*. 2013;47(10):781–92.
- Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226(2):561–5.
- Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Cepanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. 2003;13(3):145–57.
- Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60(4):145–57.
- Bica CG, de Moura da Silva LL, Toscani NV, da Cruz IB, Sá G, Graudenz MS, et al. MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. *Pathol Oncol Res*. 2009;15(1):19–24.
- Sun GG, Wang YD, Lu YF, Hu WN. Different association of manganese superoxide dismutase gene polymorphisms with risk of prostate, esophageal, and lung cancers: evidence from a meta-analysis of 20,025 subjects. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(3):1937–43.
- Oskina NA, Ermolenko NA, Boyarskih UA, Lazarev A, Petrova VD, Ganov DI, et al. Associations between SNPs within antioxidant genes and the risk of prostate cancer in the Siberian region of Russia. *Pathol Oncol Res*. 2014;20(3):635–40.
- Costa F, Dornelles E, Mânica-Cattani MF, Algarve TD, Souza Filho OC, Sagrillo MR, et al. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(4):474–81.
- Margalit DN, Jordahl KM, Werner L, Wang X, Gwo-Shu LM, Penney KL, et al. Germ line variation in superoxide dismutase-2 (SOD2) and survival outcomes after radiation therapy for prostate cancer: results of a test and validation set analysis. *Clin Genitourin Cancer*. 2015;13(4):370–7.
- Duan H, Zhang HJ, Yang JQ, Oberley LW, Futscher BW, Domann FE. MnSOD up-regulates maspin tumor suppressor gene expression in human breast and prostate cancer cells. *Antioxid Redox Signal*. 2003;5(5):677–88.
- Bus JS, Gibson JE. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect*. 1984;55:37–46.
- Miriyala S, Spasojevic I, Tovmasyan A, Salvemini D, Vujaskovic Z, St Clair D, et al. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(5):794–814.
- Sobin LH, Wittekind Ch. *TNM classification of malignant tumours*. 6th ed. Hoboken: Wiley; 2002.
- Barbisan F, de Motta J R, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, et al. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the

- Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One*. 2014;9(10): e107299.
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
 23. Cadoná FC, Cattanni MFMR, Machado AK, Oliveira RM, Flores ERS, Assmann CE, et al. Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. *Anal Methods*. 2014; 6:8559–68.
 24. Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem*. 1989; 179(1):8–18.
 25. Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol*. 2012;280(2):164–70.
 26. Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(2):251–6.
 27. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994;233:346–57.
 28. William-Faltaos S, Rouillard D, Lechat P, Bastian G. Cell cycle arrest and apoptosis induced by oxaliplatin (L-OHP) on four human cancer cell lines. *Anticancer Res*. 2006;26(3A):2093–9.
 29. Mao C, Qiu LX, Zhan P, Xue K, Ding H, Du FB, et al. MnSOD Val16Ala polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis involving 8,962 subjects. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(7):975–9.
 30. Liwei L, Chunyu L, Ruifa H. Association between manganese superoxide dismutase gene polymorphism and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Urology*. 2009;74(4):884–8.
 31. Ergen HA, Narter F, Timirci O, Isbir T. Effects of manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism on prostate cancer: a case-control study. *Anticancer Res*. 2007;27(2):1227–30.
 32. Mikhak B, Hunter DJ, Spiegelman D, Platz EA, Wu K, Erdman JW, et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*. 2008;29(12):2335–40.
 33. Wang S, Wang F, Shi X, Dai J, Peng Y, Guo X, et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk—a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009;45(16):2874–81.