Actas Urológicas Españolas

www.elsevier.es/acuro

Original - Cáncer de próstata

Evaluación de la expresión de la subunidad p22 *phox* de la NADPH oxidasa (NOX) en cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna: estudio comparativo

E. Floriano-Sánchez^a, M. Castro-Marín^c, N. Cárdenas-Rodríguez^{b,*} y E. Lara-Padilla^d

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Escuela Médico Militar, México D.F.

^bLaboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría, México D.F.

^cServicio de Urología, Hospital Central Militar, México D.F.

^dSección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México D.F.

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 10 de septiembre de 2009

Aceptado el 8 de febrero de 2010

On-line el 10 de abril de 2010

Palabras clave:

Cáncer de próstata

Hiperplasia prostática benigna

Especies reactivas de oxígeno

p22 *phox*

NADPH oxidasa

R E S U M E N

Introducción y objetivo: Recientes reportes ubican que el cáncer de próstata es el segundo cáncer más común y la segunda causa principal de muerte por cáncer en los hombres.

Métodos y resultados: Se obtuvieron 62 muestras (30 de pacientes con cáncer y 32 de pacientes con hiperplasia) colectadas desde enero de 2004 a diciembre de 2007. Se llevó a cabo un estudio clínico, experimental, transversal, comparativo y descriptivo. Se cumplieron los criterios de inclusión (diagnóstico de cáncer o hiperplasia), exclusión (pacientes que no autorizaron a participar en el estudio o no candidatos a la resección prostática) y de eliminación (tejidos dañados). Se detectó por inmunohistoquímica la presencia de la subunidad p22 *phox* de la NADPH oxidasa en pacientes con cáncer de próstata e hiperplasia prostática a partir de la formación del complejo avidina-biotina en presencia de diaminobenzidina como colorante de contraste. El análisis estadístico fue determinado con la prueba t de student (software Graph Prism 3.0) considerando una $p < 0,05$ para diferencias estadísticas. Los resultados de la inmunoreactividad de p22 *phox* en estroma y glándula de la próstata mostraron un incremento en el cáncer de próstata ($8,45 \pm 3,6$ y $25,08 \pm 7,5\%$ $p < 0,0001$, respectivamente) en comparación con los resultados encontrados para hiperplasia prostática ($4,8 \pm 2,8$ y $6,7 \pm 3,1\%$ $p < 0,0001$, respectivamente). **Conclusiones:** La sobreexpresión de NADPH oxidasa se encuentra involucrada en el cáncer de próstata. Además, sugerimos que la NADPH oxidasa, en combinación con otros marcadores clásicos, podría funcionar como un indicador para el monitoreo postoperatorio de pacientes diagnosticados con hiperplasia u otras patologías menores de la próstata.

© 2009 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: noemicr222@hotmail.com (N. Cárdenas-Rodríguez)

Evaluation of the expression of p22 *phox* subunit of NADPH oxidase (NOX) in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: A comparative study

A B S T R A C T

Keywords:

Prostate cancer
Benign prostatic hyperplasia
Reactive oxygen species
p22 *phox*
NADPH oxidase

Introduction and objective: Recent reports found that prostate cancer is the second most common cancer and second leading cause of cancer death in men.

Methods and results: 62 samples were obtained (30 of patients with cancer and 32 of patients with hyperplasia) collected from January 2004 to december 2007. Was conducted a clinical, experimental, transversal, comparative and descriptive trial. Were followed the inclusion (cancer or hyperplasia diagnosis), exclusion (patients not authorized to participate in the study or not candidates for resection of prostate) and elimination (damage tissue) criteria. Was detected by immunohistochemistry the presence of p22 *phox* NADPH oxidase subunit in patients with prostate cancer and prostatic hyperplasia from the formation of avidin-biotin complex using diaminobenzidine as a dye contrast. The statistical analysis was determined with t test (Graph Prism 3.0 software) considering $p < 0.05$ for statistical differences. The results of the immunoreactivity of p22 *phox* in the stroma and gland of the prostate showed an increase in prostate cancer (8.45 ± 3.6 and $25.08 \pm 7.5\%$ $p < 0.0001$, respectively) in comparison with the results for prostatic hyperplasia (4.8 ± 2.8 and $6.7 \pm 3.1\%$ $p < 0.0001$, respectively).

Conclusions: The over-expression of the NADPH oxidase is involved in the prostate cancer. Moreover, we suggested that the NADPH oxidase, in combination with other classical markers, could be an indicator for the post-treatment monitoring of the patients diagnosed with hyperplasia and others minors pathologies of the prostate.

© 2009 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La próstata es el órgano masculino que con mayor frecuencia padece procesos benignos o malignos tal como el cáncer o la hiperplasia. El número de hombres con cáncer de próstata (CaP) se ha incrementado en las últimas 2 décadas como resultado del envejecimiento de la población a nivel mundial¹⁻³.

Se sabe que el estrés oxidante interviene en el desarrollo del CaP. El estrés oxidante es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y las defensas antioxidantes que puede presentarse por una producción excesiva de las ERO, por disminución de las defensas antioxidantes o combinación de ambas⁴. Algunas ERO, tal como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se encuentran en una gran cantidad de tumores y en altos niveles pueden inducir muerte celular, apoptosis, senescencia y angiogénesis⁵.

La NADPH oxidasa (NOX) está compuesta por un complejo anclado en la membrana (proteína glucosilada gp91 *phox* y no glucosilada p22 *phox*) y 3 componentes citosólicos (p47 *phox*, p67 *phox*, p40 *phox*). Esta enzima juega un importante rol en el mantenimiento del balance celular de ERO ya que es una de las principales fuentes de $O_2^{\cdot-}$. El radical $O_2^{\cdot-}$, a su vez, puede convertirse más tarde en otras ERO aunque la mayor parte dismuta hacia H_2O_2 , principalmente por acción de la enzima mieloperoxidasa⁵.

Por otro lado, existen varios estudios donde se ha demostrado el papel de la NOX en cáncer de ovario y colon y únicamente en líneas celulares de CaP. Xia et al, Brar et al y Lim et al encontraron que células de cáncer de ovario, en

cáncer de colon y en la línea celular de carcinoma prostático DU145 presentaron una sobreexpresión de la NOX por lo que los autores concluyeron que las ERO desempeñan un papel importante para inducir la angiogénesis y el crecimiento tumoral⁶⁻⁸. Además, Arnold et al demostraron que la sobreexpresión de NOX1 en la línea DU145 inducen los factores de transcripción c-fos y la citosina IL-8 y con ellos, un incremento en la producción de ERO⁹.

Actualmente, los únicos estudios realizados sobre CaP son los reportados por Chaiswing et al, Kumar et al y Jajoo et al. En ellos demostraron que el uso de inhibidores de la NOX (apocinina, difeniliodonio y cloruro de dibenziodolio) y en algunos casos la inducción de la sobreexpresión de enzimas antioxidantes (Cu/Zn-superóxido dismutasa) disminuyen la habilidad invasiva, la producción de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, la activación de mitógenos como ERK1/ERK2, p38, NF- κ B, MAP cinasas y AKT en diferentes líneas celulares de CaP (DU145, PC3, LNCaP, PC3-MM, ALVA y AT6.1)¹⁰⁻¹².

De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar, comparar y analizar por primera vez la expresión protéica de la subunidad p22 *phox* de la NOX en el estroma y glándula de la próstata en pacientes diagnosticados con cáncer e hiperplasia.

Materiales y métodos

Sujetos de estudio: la recolección de muestras se llevó a cabo del mes de enero de 2004 a diciembre de 2007. Se realizó un estudio clínico, experimental, transversal, comparativo y

descriptivo. Se seleccionaron las muestras de los pacientes registrados en la libreta de cirugía del servicio de urología del Hospital Central Militar y que cumplieron con los criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Criterios de inclusión: a) pacientes con diagnóstico de CaP con síndrome obstructivo urinario bajo de la vía urinaria con diagnóstico de prostatectomía radical; b) pacientes con diagnóstico de hiperplasia prostática (HPB) con indicación de resección transuretral prostática (RTUP).

Criterios de exclusión: a) pacientes que no autorizan participar en el procedimiento; b) pacientes que no sean candidatos a RTUP.

Criterios de eliminación: a) pacientes cuyo tejido sufriera daño durante su traslado.

Los pacientes fueron sometidos a análisis clínicos, tacto rectal digital, un ultrasonido transrectal de la próstata (UTRP) y se determinaron los valores de antígeno prostático específico.

Por el análisis de tacto rectal se obtuvo que los pacientes sospechosos de HPB presentaron una glándula aumentada de tamaño pero con forma redondeada y simétrica, consistencia elástica, superficie y bordes regulares y los pacientes sospechosos de CaP presentaron una glándula aumentada de tamaño con nódulos o áreas induradas, consistencia pétrea, superficie irregular y poco movable además de asimetría en los lóbulos. En ambos casos no se presentó dolor al tacto.

Para la realización del UTRP, los pacientes asistieron con retención de orina y ayuno de no menos de 6 h y administración de ciprofloxacina 500 mg/12 h iniciando el día anterior al estudio y manteniéndola por 4 días posteriores al mismo. A los pacientes se les acostó en decúbito lateral izquierdo con flexión de ambas rodillas en 90 grados, con doble cobertura del transductor con condones y entre ambos una película de gel acústico. De acuerdo con Rifkin et al se consideraron por UTRP los siguientes patrones ecográficos¹³.

Próstata normal: próstata de ecoestructura homogénea, de bordes regulares, que no sobrepasara un volumen de 20 ml.

Próstata nodular: próstata con nódulos hipoecoicos, hiperecoicos o isoecoicos con bordes regulares e irregulares con calcificaciones o sin ellas con ecoestructura homogénea o heterogénea.

Además, para la evaluación de la próstata en busca de cáncer se tuvo en cuenta una serie de factores como son:

- La ecogenicidad y la simetría de la glándula
- Evaluación de los tejidos periprostáticos
- Evaluación de los haces neurovasculares
- Evaluación de las vesículas seminales
- Evaluación del ápex prostático
- Evaluación de los conductos eyaculadores
- Evaluación de los ganglios linfáticos periprostáticos

En los pacientes sospechosos de HPB se encontró mayoritariamente una imagen isoecóica y en los pacientes sospechosos de CaP se encontró mayoritariamente una imagen hipoecóica, además de una próstata heterogénea, nodulosa y difusa, crecimiento y asimetría glandular y distorsión capsular pero no se observaron zonas de necrosis ni infiltraciones

en la vejiga ni vesículas seminales. Estas observaciones correspondieron con lo reportado en la literatura¹⁵⁻¹⁹.

A todos los pacientes, según resultados del tacto rectal y UTRP, se les tomó una biopsia mediante punción espirativa con aguja fina según el método descrito por Kline¹⁴.

Finalmente se procedió a realizar un diagnóstico histológico de las biopsias obtenidas. Para estas muestras, se realizaron cortes los cuales fueron fijados con formaldehído tamponado al 10% (pH=7,4) e incluidos en parafina. Para el análisis histológico de cada una de los cortes incluidos, se prepararon laminillas (secciones de tejido de 3 µm) los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H y E) para la identificación de las zonas con focos tumorales o con hiperplasia prostática. De este análisis se obtuvieron los siguientes resultados:

HPB: Se presentaron elementos epiteliales en forma de conglomerado, glándulas pequeñas revestidas de una capa regular de epitelio cilíndrico alto o cúbico aplanado con membrana basal intacta. Estas observaciones coincidieron con la naturaleza de la lesión y con las características histológicas ya reportadas para el HPB²⁰.

CaP: se presentó estroma interpuesto y pérdida de la capa normal de células mioepiteliales que rodean a las células glandulares, la anaplasia nuclear fue mínima (bien diferenciado: escala 2-4 de Gleason). Se presentó desorganización en los elementos glandulares y anaplasia nuclear más pronunciada (moderadamente diferenciado: escala 5-7 de Gleason). Falta de glándulas formadas y presencia de masas sólidas de células individuales infiltrantes, anaplasia nuclear pronunciada (poco diferenciado: escala 8-10 de Gleason). Estas características coincidieron con las características histológicas ya reportadas para el CaP²⁰. En todos los casos el tumor fue calificado como clínicamente localizado.

El urólogo basándose en el tacto rectal, en las imágenes vistas por el ultrasonido y en el análisis histológico de las biopsias confirmadas con el diagnóstico de CaP indicó una prostatectomía radical y se procedió a realizar una RTUP a los pacientes con diagnóstico de HPB.

En ambos casos, la próstata extraída y las muestras de tejido obtenidas por RTUP en los pacientes con CaP y HPB, respectivamente, se prepararon para el diagnóstico histopatológico por tinción de H y E para la búsqueda de zonas con focos tumorales o con hiperplasia como se mencionó anteriormente. Debe mencionarse que los análisis histopatológicos se realizaron por 3 uropatólogos en forma independiente.

Todos los análisis inmunohistoquímicos se realizaron sobre laminillas preparadas de secciones de tejido de tres micrómetros fijados en formalina al 10% e incluidas en parafina y obtenidas a partir de los fragmentos de tejido obtenidos de las zonas tumorales localizadas en la próstata extraída por prostatectomía radical y de los fragmentos de tejido obtenidos de zonas identificadas con hiperplasia del tejido extraído por RTUP de acuerdo con los resultados obtenidos de los análisis histopatológicos descritos anteriormente.

Inmunohistoquímica: los cortes incluidos en las laminillas se desparafinaron y se calentaron para desenmascarar los sitios antigénicos; la actividad endógena de la peroxidasa fue bloqueada con 0,03% de H₂O₂ en metanol absoluto. Las secciones de tejido fueron incubadas toda la noche a 4 °C a una dilución 1:100 de anticuerpo monoclonal contra p22 *phox*,

en solución TRIS. Se removió el anticuerpo primario y se realizaron 2 lavados repetitivos con TRIS, los cortes fueron incubados con una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal de conejo como anticuerpo secundario y se realizaron 2 lavados repetitivos con TRIS. Los anticuerpos unidos se detectaron con el complejo avidina-biotina (ABC-kit Vectastain) y la diaminobenzidina como sustrato. Después de lavar repetidamente con TRIS los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina. Todos los cortes fueron incubados bajo las mismas condiciones con la misma concentración de anticuerpo y en la misma corrida, por lo tanto, la inmunotinción fue comparable. Todos los especímenes fueron examinados por el microscopio de luz Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, Germany). Para el análisis morfométrico automatizado, el porcentaje de células positivas (color marrón) se determinaron con un analizador de imágenes computarizado KS-300 3.0 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Este equipo detecta automáticamente las células positivas determinando su porcentaje por campo. Cinco campos aleatorios fueron estudiados a una

magnificación de 100 (área total $1.584.000 \mu^2$). Los resultados fueron expresados como porcentaje.

Análisis estadístico: la significancia estadística de la inmunoreactividad de los niveles de expresión de p22 *phox* entre los grupos de cáncer de próstata e hiperplasia prostática en glándula o en estroma fue determinada utilizando el software Graph Prism 3.0 con la prueba «t de student». Los datos se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar. Se consideró una $p < 0,05$ como diferencia estadística entre ambos grupos.

Resultados

De un total de 62 pacientes se obtuvieron 30 pacientes con diagnóstico histopatológico establecido de CaP (48,4%) y 32 pacientes con diagnóstico establecido de HPB (51,6%).

Dentro del grupo de pacientes con diagnóstico de CaP la edad promedio fue de 65,3 años y la concentración de antígeno prostático específico preoperatorio en este grupo fue de 8,6 ng/ml; el puntaje en la escala de Gleason fue de 4 en 1 caso (3,3%), de 6 en 19 casos (63,3%), de 7 en 9 casos (30%), de 8 en 1 caso (3,3%).

En el grupo de pacientes con diagnóstico establecido de HPB, la edad promedio fue de 66,5 años, el promedio de concentración de antígeno prostático específico preoperatorio fue de 8,7 ng/ml.

Los niveles de expresión de la subunidad p22 *phox* de la NOX obtenidos en el grupo de HPB se presentan en la [tabla 1](#).

Como es posible observar, los niveles de expresión de NOX fueron 1,76 y 3,74 veces significativamente más altos en estroma y glándula, respectivamente en CaP en comparación con el grupo de HPB. Además, la expresión fue significativamente mayor en la parte glandular de ambos grupos de estudio ([fig. 1](#)).

Tabla 1 – Niveles de expresión de la subunidad p22 *phox* en CaP y HPB

Parámetros	estroma	Glándula
HPB	$4,8 \pm 2,8$	$6,7 \pm 3,1^a$
CaP	$8,45 \pm 3,6^c$	$25,08 \pm 7,5^{d,b}$

CaP: cáncer de próstata; HPB: hiperplasia prostática.

^a $p = 0,0125$ vs. estroma HPB.

^b $p < 0,0001$ vs. estroma CaP.

^c $p < 0,0001$ vs. estroma HPB.

^d $p < 0,0001$ vs. glándula de HPB.

Los resultados son expresados como media $\pm$ desviación estándar.

Figura 1 – Determinación por inmunohistoquímica de p22 *phox* en la glándula y estroma en CaP y HPB. A) Glándula de CaP. B) Glándula de HPB. C) Estroma de CaP. D) Estroma de HPB, respectivamente. En ambos grupos, se determinó el % de área marcada por campo (400 $\times$). Se encontró un incremento significativo en la inmunorreactividad de p22 *phox* en el grupo de CaP ($p < 0,0001$).

Discusión

Los resultados obtenidos, por primera vez, en este estudio muestran un aumento de porcentaje de área en la expresión de la subunidad p22 *phox* de la NOX en el estroma y la glándula de la próstata en pacientes diagnosticados con cáncer con respecto a los pacientes diagnosticados con hiperplasia encontrando, además, un incremento significativo en su expresión en la parte glandular en ambos grupos de estudio.

En estudios anteriores, se ha observado que la generación de ERO en la línea celular de CaP DU 145 se redujo con el uso de un inhibidor de flavoproteínas. También se demostró que la expresión de las tres principales subunidades de la NOX: gp91 *phox*, p47 *phox* y p67 *phox* se redujo, en consecuencia, los autores concluyeron que la NOX posee un papel como mecanismo de señalización que regularía el crecimiento y la apoptosis celular en el CaP^{21,22}.

Por otro lado, parece que las células endoteliales expresan todos los componentes de la NOX incluida la gp91 *phox*, p22 *phox*, p47 *phox* y p67 *phox* y en las células de músculo liso vascular expresan p22 *phox* y p47 *phox*. Sin embargo, en la línea celular DU145 aunque fue identificada gp91 *phox*, la proteína de p22 *phox* no fue detectable aunque sí el ARNm^{21,23,24}. La observación anterior es controversial con respecto a lo obtenido en este estudio ya que se logró cuantificar la expresión de la proteína de p22 *phox* en biopsias de CaP.

Debe mencionarse que el lugar exacto de las vías de señalización de la NOX actualmente permanece incierto y pueden ser tejido específicas aunque en estudios previos han sugerido que esta enzima puede tener un papel en el mecanismo de señalización que regula el crecimiento celular y la apoptosis en el CaP²¹. Cabe mencionar que ya se ha demostrado que la angiotensina II estimula la actividad de la NOX en músculo liso vascular vía proteína cinasa y en parte a través de NF-κB en las vías respiratorias y en los melanomas, pero aún no ha sido estudiado en pacientes con CaP²⁵.

En otro estudio encontraron que altos niveles de ERO fueron producidas espontáneamente en CaP y en cáncer de ovario. Esta elevada producción de especies reactivas fue inhibida con el uso de un inhibidor de la NOX, el difenilén iodonio y el inhibidor de la cadena de electrones mitocondrial rotenona²⁶. Además, ya está demostrado que la isoforma NOX1 induce al factor de crecimiento endotelial vascular así como la expresión de su receptor en varios tumores²³. Por otro lado, se encontró que en células de cáncer de ovario existe un incremento en la producción de ERO el cual fue proporcional con la expresión de la NOX y con la expresión del factor HIF-1 (hipoxia inducida por factor 1)²⁷. También se ha observado que en la línea celular DU145 transfectada con la NOX1 se incrementa el crecimiento tumoral y la producción de H₂O₂²³.

Todo lo anterior parece indicar que tanto los cambios del estado redox celular cuando las células pasan de normales a aberrantes, donde estaría implicada la producción de O₂^{•-} y las diferencias en la arquitectura de la próstata, estarían conduciendo la invasión de células cancerosas en este tejido.

Conclusiones

La sobreexpresión de la NADPH oxidasa se encuentra activamente involucrada en el CaP. Además, sugerimos que la NADPH oxidasa, en combinación con otros clásicos marcadores tal como antígeno prostático específico, podría funcionar como un indicador para el monitoreo postoperatorio de pacientes diagnosticados con hiperplasia u otras patologías menores de la próstata.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Haas GP, Sakr WA. Epidemiology of prostate cancer. *CA Cancer J Clin.* 1997;47:273-87.
2. Ahmed MM, Lee CT, Oesterling JE. Current trend in the epidemiology of prostatic disease: benign hyperplasia and adenocarcinoma. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1997.
3. Pow-Sang M, Destefano V, Astigueta JC, Castillo O, Gaona JL, Santaella F, et al. Prostate cancer in Latin America. *Actas Urol Esp.* 2009;33:1057-61.
4. Ramírez Backhaus M, Trassiera Villa M, Vera Donoso CD. Photodynamic therapy in localised prostate cancer. *Actas Urol Esp.* 2007;31:633-41.
5. Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett.* 2008;266:37-52.
6. Xia C, Meng Q, Liu LZ, Rojanasakul Y, Wang XR, Jiang BH. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2007;67:10823-30.
7. Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarius B, et al. NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285:C353-69.
8. Lim SD, Sun CQ, Lambeth JD, Marshall F, Amin M, Chung L, et al. Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer. *Prostate.* 2005;62:200-7.
9. Arnold RS, He J, Remo A, Ritsick D, Yin-Goen Q, Lambeth JD, et al. Nox1 expression determines cellular reactive oxygen and modulates c-fos-induced growth factor, interleukin-8, and Cav-1. *Am J Pathol.* 2007;171:2021-32.
10. Chaiswing L, Zhong W, Cullen JJ, Oberley LW, Oberley TD. Extracellular redox state regulates features associated with prostate cancer cell invasion. *Cancer Res.* 2008;68:5820-6.
11. Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res.* 2008;68:1777-85.
12. Jajoo S, Mukherjee D, Watabe K, Ramkumar V. Adenosine A(3) receptor suppresses prostate cancer metastasis by inhibiting NADPH oxidase activity. *Neoplasia.* 2009;11:1132-45.
13. Rifkin MD, Kurtz AB, Choi HY, Goldberg BB. Endoscopic ultrasonic evaluation of the prostate using a transrectal probe: prospective evaluation and acoustic characterization. *Radiology.* 1983;149:265-71.
14. Kline TS. Handbook of fine aspiration biopsy cytology, 2nd ed. New York: Churchill; 1998.
15. Muller-Lisse UL, Hofstetter A. Urological diagnosis of prostate carcinoma. *Radiologe.* 2003;43:432-40.

16. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics. *Cancer J Clin.* 2001;51:15-36.
17. Boyle P, Gandini S, Baglietto L, Seberi G, Robertson C. The epidemiology of prostate cancer. *Eur Urol.* 2001;39(Suppl 4):2-3.
18. Brawley OW, Bames S. The epidemiology of prostate cancer in the United States. *Semin Onc Nurs.* 2001;17:72-7.
19. Herranz Amo F, Díez Cordero JM, Verdú Tartajo F, Castaño González I, Moralejo Gárate M, Martínez Salamanca JI, et al. Evolution of the clinical, echographic and pathological characteristics of patients with indication of transrectal ultrasound and prostate biopsy between 1994 and 2003. *Actas Urol Esp.* 2005;29:55-63.
20. Borley N, Feneley MR. Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian J Androl.* 2009;11:74-80.
21. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:1428-59.
22. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox 5. *Gene.* 2001;269:131-40.
23. Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, et al. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99: 715-20.
24. Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, et al. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:5550-5.
25. Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, et al. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res.* 2002;90: E58-E65.
26. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999;92: 1454-76.
27. Hu T, Ramachandrarao SP, Siva S, Valancius C, Zhu Y, Mahadev K, et al. Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF- β -induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289:F816-25.