

11202

3

29

EL SULFATO DE COLESTEROL Y LA COMPOSICION DE LIPIDOS DEL  
ERITROCITO EN LA ICTIOSIS RECESIVA LIGADA AL X

TRABAJO CON  
FALLA DE ORDEN

Alumno.- Sergio A. Cuevas C.  
Asesor.- Dr. Juan C. Díaz Zagoya.  
Coasesor.- Dra. Susana H. Kofman E.  
Dr. Marco A. Juárez O.

Maestría en Ciencias Médicas.  
Departamento de Bioquímica.  
Hospital General de México SSA.  
Facultad de Medicina UNAM.

112



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

Glosario.....	1
Resumen.....	2
Summary.....	3
Antecedentes.....	4
Problema y Justificación.....	11
Objetivos.....	13
Hipótesis.....	13
Material y Métodos.....	15
Procedimientos.....	17
Resultados.....	24
Discusión.....	40
Conclusión.....	48
Bibliografía.....	49

## G L O S A R I O   D E   A B R E V I A T U R A S

- ILX.- Ictiosis Recesiva Ligada al Cromosoma X.
- SC.- Sulfato de Colesterol.
- SE.- Sulfatasa de Esteroides.
- DHEAS.-Sulfato de Dehidroepiandrosterona.
- DHEA.- Dehidroepiandrosterona.
- E<sub>1</sub>S.- Sulfato de Estrona.
- PE.- Fosfatidiletanolamina.
- PS.- Fosfatidilserina.
- PI.- Fosfatidilinositol.
- PC.- Fosfatidilcolina.
- SM.- Esfingomiélinea.
- LDL.- Lipoproteína de Baja Densidad.
- TLC.- Cromatografía en Placa Fina (Thin Layer  
Chromatography).
- SDS.- Sulfato-Dodecil-Sódico.

## RESUMEN

Reportes previos han estudiado en diversas regiones corporales las modificaciones en la composición de lípidos en la ictiosis recesiva ligada al X (ILX) paralelas a la acumulación de sulfato de colesterol (SC) producto de la deficiencia de la actividad de la sulfatasa de esteroides (SE). En el presente trabajo se analiza la composición relativa de los distintos fosfolípidos en la membrana del eritrocito. en donde se encontró un aumento en la concentración de SC. Como en otras poblaciones celulares, también en esta célula se encuentra modificada la composición de lípidos. La fosfatidiletanolamina (PE) muestra un incremento ( $p < 0.05$ ) y la fosfatidilcolina (PC) una disminución ( $p < 0.05$ ), los demás fosfolípidos tienen una composición similar a la del grupo control. Por otro lado, los ácidos grasos de cadena larga C20, C22 y C24, no se encontraron presentes en la ILX, ni los insaturados C18:2, C18:3 y C22:6. Contrariamente, C16:2 mostró una mayor composición porcentual en los pacientes ( $p < 0.05$ ). Dichos cambios podrían ser secundarios al aumento del SC, indicando una interacción muy estrecha entre los componentes lipídicos de la membrana del eritrocito. Por otra parte, la identificación del SC por TLC en el extracto de lípidos, podría ofrecer una posibilidad para el diagnóstico de estos pacientes.

## S U M M A R Y

Biochemical studies of patients with X-linked ichthyosis (ILX) have shown that increased amounts of cholesterol sulfate are present in erythrocyte membrane due to steroid sulfatase deficiency. In addition, previously reports have found abnormal composition of lipids in several cell populations in ILX. In the present study, we analyzed phospholipids and free fatty acids composition in erythrocyte membrane. Phosphatidylethanolamine was higher in ILX than in normal controls ( $p < 0.05$ ), while phosphatidylcholine was lower ( $p < 0.05$ ). On the other hand, long-chain fatty acids C20, C22 and C24 as well as unsaturated C18:2, C18:3 and C22:6 were not detectable in ILX. Conversely, C16:2 was increased ( $p < 0.05$ ). In conclusion, the increase in cholesterol sulfate in erythrocyte membrane is associated with modification of phospholipids and free fatty acids composition; whether these changes have a physiological significance is under discussion. Furthermore, identification of cholesterol sulfate in the extract of blood lipids by thin layer chromatography provides an alternative method for the diagnosis of this form of ichthyosis.

## ANTECEDENTES

Las ictiosis son un grupo de dermatosis caracterizadas por engrosamiento del estrato córneo que se manifiesta clínicamente por una descamación anormal. Actualmente, pueden distinguirse 4 tipos principales y otras condiciones ictiosiformes aún no bien definidas genéticamente<sup>(1)</sup>. La ictiosis recesiva ligada al cromosoma X (ILX) es una entidad que afecta a 1 de cada 6,000 hombres<sup>(1)</sup>. En 1965, Kerr y cols., estudiando sus manifestaciones clínicas y árbol genealógico, pudieron considerarla como una enfermedad distinta a las demás ictiosis<sup>(2)</sup>. Los hallazgos presentes en este padecimiento incluyen la aparición de sintomatología en los primeros años de vida, escamas generalizadas, oscuras, en pabellones auriculares, cuello, zonas de flexión, cara anterior de abdomen, plantas de los pies y ocasionalmente en espalda. En algunos casos se asocia hipogonadismo<sup>(3)</sup>, criptorquidia, anosmia<sup>(4)</sup>, retardo mental y epilepsia, definiendo lo que se conoce como síndrome de Rud<sup>(5)</sup>. Histológicamente se ha reportado hipertrofia y cambios no específicos en la zona granular de la epidermis<sup>(1)</sup>. En algunos pacientes se han observado opacidades corneales<sup>(6)</sup>.

En 1978, Shapiro y cols.<sup>(7,8)</sup>, encontraron en el cultivo de fibroblastos de piel de pacientes con ILX, una deficiencia en la actividad de la sulfatasa esteroidea (SE). Esta deficiencia enzimática se encontró previamente en la

placenta de las madres que presentaban niveles bajos de estriol y retardo en la labor del parto, sin relacionarlo directamente con la enfermedad<sup>(9)</sup>. En forma independiente se descubrió la deficiencia de esta enzima en pacientes con ILX y su asociación con las madres que presentaban dicha alteración a nivel placentario<sup>(10)</sup>.

El gen que codifica para la SE se ubica en el brazo corto del cromosoma X en la región de bandeo xp22.3<sup>(11)</sup>. Estudios moleculares han revelado que del 80% al 90% de los pacientes con ILX presentan deficiencia enzimática como consecuencia de deleciones completas en las secuencias codificantes, mientras que en el resto no se han demostrado alteraciones importantes en este gen<sup>(12,13)</sup>.

La SE es una de las 3 arilsulfatasas de los tejidos humanos (A, B y C). Las formas A y B son lisosomales y sus substratos naturales son los sulfátidos de cerebrósidos y el sulfato de dermatán, respectivamente. La arilsulfatasa C (E.C.3.1.6.2) se encuentra unida a la membrana microsomal y tiene como substratos a los sulfatos de 3-beta-hidroxiesteroides. De aquí, que también se conozca como SE<sup>(14)</sup>. Cabe considerar que bajo evidencias químicas y genéticas, todo parece indicar que la arilsulfatasa C comprende dos isoenzimas, caracterizadas por su movilidad electroforética diferente (s y f), codificadas por genes distintos, en cuyo caso únicamente la forma "s" (de slow) correspondería a la SE propiamente dicha<sup>(15,16)</sup>.



Los substratos de la SE son el sulfato de colesterol (SC), el sulfato de estrona ( $E_1S$ ) y el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), siendo este último el de mayor afinidad. Esta enzima ha sido encontrada en todos los tejidos examinados i.e., placenta humana, tiroides, corazón, hígado, músculo esquelético, adrenales, decidua y membranas fetales, testículo, ovario, corion y células cancerosas de mama, vagina, ovario, endometrio y en la hipertrofia prostática benigna<sup>(16-22)</sup>. Su pH óptimo oscila entre 6.5 y 7.5 siendo su Km ( $\mu M$ ) de 8.7 para el  $E_1S$  y de 4.3 para el DHEAS<sup>(22)</sup>. Su acción, como su nombre lo indica, consiste en desulfatar hidrolizando los substratos para que éstos puedan entrar a sus vías metabólicas<sup>(23)</sup>.

Como consecuencia de la deficiencia de la SE, la patogénesis de la ILX se asocia a la acumulación de SC en suero, membrana de los eritrocitos y estratos córneo y granuloso<sup>(24)</sup>. En condiciones normales, existe una relación entre el colesterol y el SC. Esta relación en sangre y epitelio intestinal es de 500:1, y en los estratos córneos de controles y de pacientes con ILX de 10:1<sup>(24,25)</sup> y 1:1<sup>(24)</sup>, respectivamente. Mientras en la epidermis de sujetos sanos los niveles de SC son más bajos en las capas basal y espinosa y más altos en la granulosa, en la ILX los niveles sólo son discretamente más altos en la epidermis baja, elevándose progresivamente en el estrato córneo<sup>(26)</sup>. La actividad de la SE en la piel es máxima en los estratos

córneo y granuloso y prácticamente nula en las capas inferiores de la epidermis<sup>(26)</sup>, lo que explicaría el por qué de la acumulación del SC sólo en las capas superiores de la piel en los pacientes con ILX.

Los lípidos constituyen del 6 al 10% del estrato córneo, ocupando preferentemente los espacios intercelulares. Se ha propuesto que la regulación de la relación colesterol/SC en el complejo estrato córneo-membrana puede ser crítico en el proceso normal de descamación<sup>(26)</sup>. Además, diversos estudios han puesto de manifiesto una serie de cambios graduales en la composición de lípidos en los distintos estratos de la epidermis. La epidermis pierde fosfolípidos y genera esteroides libres durante su diferenciación<sup>(27)</sup>. El estrato granuloso contiene una gran cantidad de esfingolípidos con ácidos grasos de cadena larga y saturada, así como ceramidas y glucolípidos. La relación glucolípido/ceramida disminuye en el estrato córneo, desapareciendo los glucolípidos en su región más externa<sup>(28)</sup>. Existe evidencia que sugiere que los lípidos son importantes para la estructura y función normales de esta capa<sup>(29)</sup>. Además de saber de su papel importante en la función de permeabilidad epidérmica, se ha sugerido que pueden ser esenciales en el proceso normal de descamación<sup>(24)</sup>.

El SC se encuentra distribuido ampliamente en los tejidos de los mamíferos. Se ha reportado su presencia en hígado, timo, pulmón, corazón, riñón, cerebro, adrenales,

ojo, testículo, próstata, útero, ovario, y en fluidos biológicos como semen, saliva, plasma, orina, bilis y heces<sup>(30)</sup>. En un inicio, se le atribuyó: como transportador de colesterol entre varios tejidos, como intermediario en el metabolismo del colesterol y como un componente importante de la membrana celular<sup>(30)</sup>. Actualmente, se le ha asignado ser precursor de los sulfatos 3-beta-hidroxiesteroides en el tejido adrenal<sup>(31)</sup>, participando en las modificaciones de la membrana del espermatozoide que ocurren antes y durante el proceso de fertilización<sup>(32)</sup>, como estabilizador de la membrana y por su presencia en heces y bilis como producto de excreción<sup>(33)</sup>. Estudios más recientes *in vitro* indican diversas participaciones del SC en distintas vías metabólicas. En queratinocitos y fibroblastos se ha observado que inhibe la formación de los esteroides y la actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (enzima clave en la regulación de la síntesis de colesterol)<sup>(34,35)</sup>. En queratinocitos, *in vitro*, incrementa la incorporación de acetato a los ácidos grasos, diacilgliceroles, triacilgliceroles y fosfolípidos<sup>(35)</sup> e inhibe la esterificación de esteroides.

Otro de los efectos importantes descritos para el SC es su participación en la estabilización de la membrana. Estudios en el eritrocito indican que la forma bicóncava de esta célula se conserva en soluciones salinas hipotónicas cuando se adicionan cantidades fisiológicas de SC a las soluciones<sup>(36)</sup>. Así mismo, se ha reportado que disminuye la

fragilidad osmótica de los eritrocitos expuestos a soluciones salinas hipotónicas, al parecer con cierto grado de especificidad, ya que tanto el sulfato como la porción del esterol son esenciales para esta actividad<sup>(36)</sup>.

Además de la acumulación de SC en la epidermis de los pacientes con ILX, se ha reportado otra serie de modificaciones en la composición de lípidos<sup>(24)</sup>. Aún cuando la concentración total de lípidos en piel no difiere significativamente de los sanos, su composición relativa se ve afectada. Existe una disminución marcada en la composición de lípidos neutros totales y de esteroles libres, aunque la composición de esteroles totales es similar a la de los sujetos normales. De esta manera, pudiera considerarse que también este tipo de lípidos desempeña un papel importante en la descamación en la ILX.

Los cambios reportados en la composición de lípidos en la ILX, no se limitan a la piel. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales transportan al SC, presentan una movilidad electroforética aumentada, comparándolas con las LDL de controles sanos o de otro tipo de ictiosis<sup>(37)</sup>. El contenido de los ésteres de colesterol en las LDL disminuye en la ILX, mientras que las relaciones entre triglicéridos/colesterol y apoproteína B/colesterol aumentan<sup>(38)</sup>.

Otra de las poblaciones celulares afectadas en la ILX es el eritrocito. Los estudios al respecto indican que

también presenta un incremento en la cantidad de SC. Cerca de la mitad de la masa de la membrana del eritrocito humano está constituida por lípidos<sup>(39)</sup>. Los fosfolípidos y el colesterol no esterificado corresponden a más del 95% del total de lípidos en la membrana. También se encuentran presentes pequeñas cantidades de glucolípidos, glicéridos y ácidos grasos libres<sup>(40)</sup>. Los fosfolípidos se dividen en subclases y su concentración aproximada en el eritrocito es la siguiente:

fosfatidilcolina (PC)	30%;
fosfatidiletanolamina (PE)	28%;
fosfatidilserina (PS)	14%

(generalmente dependiendo el tipo de procedimiento de separación, la PS incluye cantidades pequeñas, consideradas dentro del porcentaje de composición, de fosfatidilinositol (PI) ); esfingomielina (SM) 25%. Normalmente, cada fosfolípido presenta dos ácidos grasos esterificados en las posiciones 1 y 2 de su esqueleto de glicerol, uno de cadena saturada y el otro de cadena insaturada. Esta condición confiere una característica muy importante a los fosfolípidos como reguladores de la fluidez de la membrana. La longitud y saturación del ácido graso determina su estado físico y por tanto su estado de fluidez. La longitud de la cadena determina el volumen de la fase hidrofóbica, y los dobles enlaces introducen giros, modificando la estructura espacial. Por lo tanto, es de suma importancia la temperatura de transición o punto de fusión determinado por estas características<sup>(41)</sup>, ya que de esta manera la célula regula el estado de fluidez de su membrana.

## PROBLEMA Y JUSTIFICACION

El conocimiento actual de las alteraciones en la ILX, así como estudios *in vitro*, han permitido conocer algunas de las funciones del SC como posible regulador en el metabolismo de algunos lípidos, en el proceso de descamación que ocurre normalmente en la piel y su efecto en el eritrocito como estabilizador de su membrana<sup>(26,30-33)</sup>. En la ILX se ha observado que no únicamente el SC se encuentra aumentado en distintas regiones, sino que además la composición relativa de lípidos se modifica en forma conjunta. Como parte de estos cambios, se sabe de la disminución en la piel de los lípidos neutros y de algunos de los esteroides totales<sup>(26)</sup> y en las LDL del aumento de los triacilglicérols y disminución de los ésteres de colesterol<sup>(38)</sup>. Por otro lado, el eritrocito ha sido un modelo de estudio para el conocimiento en la composición de lípidos, principalmente fosfolípidos y ácidos grasos, en diferentes padecimientos en los cuales se han reportado una serie de alteraciones sin ser la causa primaria de afectación, tal es el caso del la diabetes mellitus insulino dependiente, fibrosis cística, Kwashiorkor, Marasmo, Adrenoleukodistrofia, síndrome de Reyes y enfermedad de Kawasaki<sup>(42-47)</sup>. En relación a ésto, consideramos importante identificar, ante las modificaciones descritas previamente en la ILX, si la composición de fosfolípidos y ácidos grasos se encuentra alterada en los hematíes de estos

pacientes. Cabe mencionar también, que los eritrocitos se seleccionaron para el presente trabajo porque, además de presentar acúmulo de SC, se puedan obtener fácilmente con un procedimiento no invasivo, no pueden sintetizar fosfolípidos de novo, alterar la longitud de la cadena ni el grado de insaturación de sus ácidos grasos<sup>(47,48)</sup>. Por lo tanto, consideramos que la utilización del eritrocito como modelo de estudio nos permitirá distinguir si existen o no cambios en la composición de los lípidos mencionados, que reflejen lo sucedido en otras regiones.

Con base en lo anterior, nuestro planteamiento se resume en dos hechos a comprobar:

1.- ¿ Existe una modificación en la composición relativa de los fosfolípidos del eritrocito en pacientes con ILX ?.

2.- ¿ Existe una modificación en la composición relativa de los ácidos grasos del eritrocito en pacientes con ILX ?.

## OBJETIVOS

1.- Conocer si existen modificaciones en la composición relativa de los fosfolípidos del eritrocito en pacientes con ILX.

2.- Conocer si existen modificaciones en la composición relativa de los ácidos grasos del eritrocito en pacientes con ILX.

## HIPOTESIS

### ALTERNAS:

1.- La composición relativa de los fosfolípidos del eritrocito se encuentra modificada en pacientes con ILX.

2.- La composición relativa de los ácidos grasos del eritrocito se encuentra modificada en pacientes con ILX.



NULAS:

1.- La composición relativa de fosfolípidos del eritrocito es similar en los pacientes con ILX y en el grupo control.

2.- La composición relativa de los ácidos grasos del eritrocito es similar en los pacietnes con ILX y en el grupo control.

## MATERIAL Y METODOS

### SELECCION DE LA MUESTRA

Los pacientes corresponden al servicio de Genética y/o Dermatología del Hospital General de México SSA.

*Grupo Problema.*- Pacientes con ILX.

*Grupo Control.*- Sujetos sanos.

### Criterios de Inclusión

*Grupo Problema.*- Pacientes sin actividad enzimática en leucocitos mononucleares de la SE.

*Grupo Control.*- Sujetos clínicamente sanos (asintomáticos y sin escamas), con actividad de la SE y de sexo masculino.

### Criterios de Exclusion

Para ambos grupos que no acepten participar en el estudio y/o que estén recibiendo cualquier tratamiento, o lo hayan recibido en un lapso menor a un mes previo a la toma de la muestra.

### Tamaño de la muestra

Considerando un nivel alfa de 0.05 y un nivel beta de 0.1, esperando una diferencia de cuando menos el 40%, el tamaño de la muestra sería de 3 pacientes como mínimo.

## REACTIVOS UTILIZADOS

### *Productos Biológicos:*

1) Sangre de pacientes con ILX y de sujetos sanos para la obtención de:

- a) Mononucleares y
- b) Eritrocitos

### Reactivos:

1) Sulfato de dehidroepiandrosterona-<sup>3</sup>H (DHEAS-<sup>3</sup>H) (New England Nuclear).

2) Estándares de lípidos: fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, esfingomielina, sulfato de colesterol, sulfato de dehidroepiandrosterona y ácidos grasos metilados (Sigma).

3) Solventes orgánicos (metanol, ácido acético, cloroformo, isopropanol, hexano y benceno). Todos los solventes fueron de grado analítico y redestilados previamente a su utilización.

### Aparatos de Medición

1) Cromatofolio de sílica gel G-60 para Cromatografía en Placa Fina (TLC, Thin Layer Chromatography), base plástico.

2) Cromatógrafo de gases Packard 433.

3) Densitómetro CDS 220 Beckman.

4) Contador de Centelleo de líquidos Packard 325.

# PROCEDIMIENTOS

## TOMA DE LA MUESTRA

Las poblaciones celulares a utilizar corresponden: primero, a los leucocitos (mononucleares) para la determinación enzimática de la SE con el fin de clasificar al grupo problema, y segundo, a los eritrocitos como célula de estudio para la composición de fosfolípidos y ácidos grasos.

1.- *Toma de sangre.*- Se realizó con el paciente en ayunas para todos los estudios. Se tomaron 10 ml de sangre de las venas del pliegue del brazo con jeringa de plástico, estéril, con 10 UI de heparina por ml de sangre, aproximadamente. De esta toma se extraen ambas poblaciones celulares (leucocitos y eritrocitos).

2.- *Separación de leucocitos (mononucleares) (49-52).*- Se diluye la sangre obtenida con un volumen igual de solución fisiológica y se adiciona Ficoll-Hypaque (densidad 1.077) en una relación 5:2 (el rango de dilución puede oscilar entre 5:1 y 5:3). Es importante que la aplicación del Ficoll-Hypaque quede en la parte inferior de la muestra respetándose la interfase, misma que debe ser conservada para asegurarse de la separación de mononucleares del resto de la sangre. Esto puede obtenerse de dos maneras: la primera aplicando al

inicio el Ficoll-Hypaque y deslizando suavemente la sangre diluida, y segundo aplicado el Ficoll-Hypaque con una pipeta pasteur, que descanse sobre el fondo de la muestra, para que de esta manera el Ficoll desplace hacia arriba la muestra de sangre. Se centrifuga la muestra durante 30 min a 1500 rpm,  $r = 12.5$  cm. Los mononucleares forman un anillo separando el suero del Ficoll, quedando en la parte inferior el paquete de eritrocitos junto con los polimorfonucleares. La banda de mononucleares se aspira con cuidado, se lava en una ocasión con solución fisiológica y se procede a lisar a los eritrocitos obtenidos por contaminación con solución de cloruro de amonio al 0.85% durante 10 min (aproximadamente 3 ml para el paquete obtenido). Se lava nuevamente el paquete en 3 ocasiones con solución fisiológica.

3.- *Separación de Eritrocitos* (52,53).- Al paquete de eritrocitos obtenidos por la separación anterior (fase sedimentaria), se procede a diluir con un volumen igual de solución fisiológica y se le agrega dextrán 500 al 6% en solución salina en relación 5:2, se incuba a 37°C durante 30 minutos desechandose posteriormente el sobrenadante. El paquete así obtenido de eritrocitos se lava en 3 ocasiones con solución fisiológica y se aplica corriente de nitrógeno (esto último como efecto protector de la posible peroxidación de lípidos).

4.- *Ensayo de la Actividad Enzimática*<sup>(53)</sup>.- Para la estandarización, se utilizó la población de mononucleares obtenida de la manera descrita anteriormente. La muestra fue resuspendida en 1 ml de amortiguador-tris 0.014 M frío a diferentes valores de pH, como se muestra en los resultados. En algunos ensayos se utilizó SDS 10 mg/dl como detergente. Las células fueron rotas utilizando un Polytrón T-100 con vástago del número 10, a la velocidad máxima en dos ciclos, uno de 20 segundos y otro de 10. Con el objeto de determinar las condiciones óptimas del ensayo, del homogenado resultante se tomaron alícuotas para los ensayos contra tiempo, pH, concentraciones de proteína y sustrato, presencia de detergente y efecto del ayuno (ver resultados). Se utilizó como sustrato al DHEAS-<sup>3</sup>H, obteniéndose como producto a la dehidroepiandrosterona-<sup>3</sup>H (DHEA-<sup>3</sup>H). La reacción se realizó a 37°C, en un volumen total de 150 µl de amortiguador-tris. Con el propósito de detener la reacción y extraer al producto (DHEA-<sup>3</sup>H) se aplicó 1 ml de benceno frío, agitándose vigorosamente en vortex durante 2 minutos y centrifugándose 5 minutos a 2500 rpm. De la fase superior (sobrenadante de benceno), fueron extraídos 600 µl a los cuales se les aplicó 5 ml de líquido de centelleo para ser leídos posteriormente por espectrometría de centelleo de líquidos. Para asegurarse de la extracción exclusiva de DHEA-<sup>3</sup>H se utilizó TLC. Los ensayos fueron realizados por duplicado y contra un blanco.

5.- *Extracción de Lípidos del Eritrocito*<sup>(54)</sup>. - Para la extracción se utilizó isopropanol. De la muestra de eritrocitos obtenida se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ l y se adicionó un volumen igual de NaCl 0.9%. Con el fin de lisar a las células, éstas se congelaron durante 10 minutos a  $-47^{\circ}\text{C}$  e inmediatamente después fueron calentadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Se adicionaron 5 ml de isopropanol y se agitaron fuertemente por 3 minutos. Se agregó sulfato de sodio anhidro para extraer el agua excedente y se agitó nuevamente durante 3 minutos, centrifugándose a 2,500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante obtenido se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y las muestras se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

6.- *Determinación de Proteínas (Bradford)*<sup>(55)</sup>. Para referencia del ensayo enzimático, se determinaron proteínas por el método de Bradford. Brevemente, se tomaron alícuotas del homogenado de leucocitos (de 50 a 100  $\mu$ l), aforándose con amortiguador tris a 100  $\mu$ l, se adicionan 5 ml del reactivo de Bradford (100 mg de Azul de Coomassie brillante G-250 en 50 ml de etanol al 95% a la cual se agregan 100 ml de ácido fosfórico al 85% w/v, esta solución es llevada a un volumen final de 1 l con agua destilada) y se lee 2 minutos después a 595 nm. Para la curva de regresión se utilizan alícuotas de 25, 50, 75 y 100  $\mu$ l de albúmina sérica bovina 1mg/1ml y se aforan a 100  $\mu$ l con el amortiguador utilizado. Se adicionan los 5 ml del reactivo de Bradford y se lee de igual forma.

7.- *Determinación de Fosfolípidos por TLC (56-60).*

Para la identificación de los distintos tipos de fosfolípidos se utilizó TLC. Los cromatofolios de 20 x 20 cm, (Merck, sílica gel G-60, fase normal con base de plástico), fueron cortados para obtener placas de 10 x 10 cm. Cada cromatofolio fue desarrollado previamente con metanol (Merck) y calentado 100 °C durante 10 minutos para su activación y eliminación posible de contaminantes. Se probaron diversos sistemas de solventes para encontrar la separación más adecuada de los fosfolípidos, que nos permitiera visualizar al SC, sin afectar la visualización de éstos. Se utilizó cloroformo/metanol/ácido acético/agua en proporciones 25:15:3.6:2 (v/v/v/v). En cada cromatofolio se aplicaron estándares y las muestras problemas a 1 cm del origen y 1 cm de cada lado con una distancia de 8 mm entre cada muestra. Previamente al desarrollo del cromatograma, la cámara de cromatografía (con medidas de 19 x 19 x 9 cm) se mantuvo con desecadores por 30 minutos y se estabilizó con el sistema de solventes seleccionado otros 30 minutos a 4°C. Finalmente, fue sellada con silicón. La cromatografía se desarrolló hasta 8.5 cm del origen, se secó con aire durante 5 minutos y después se calentó 2 minutos a 100 °C, para asegurarse de la evaporación de los solventes. Para revelar el cromatograma se utilizó acetato de cobre al 3% en ácido fosfórico al 8% acuoso, calentando posteriormente durante 8 minutos a 100 °C, hasta la visualización de los fosfolípidos. La lectura de los



fosfolípidos visualizados fue llevada a cabo con un densitómetro Beckman CDS 220 en el modo transmitancia a 550 nm. Todos los ensayos fueron hechos por duplicado.

8.- *Determinación de ácidos grasos* (54,61,62). Se realizó mediante cromatografía gas-líquida, en un cromatógrafo de gases Packard modelo 433 con un detector de ionización por flama y una columna de polifenilcianopropilmetilsiloxano (OV-225) de 10 m x 0.53 mm. Como fase móvil se utilizó N a una velocidad de 12 ml/seg y para el detector H y O<sup>2</sup>. Para la identificación de los ácidos grasos por cromatografía fue necesaria su metilación. Para esto, al extracto total de lípidos resuspendido en 1 ml de benceno, se le adicionaron 2 ml de solución metanólica de metóxido de sodio 0.5 N (preparada con una parte de 2.3 g de sodio metálico en 40 ml de benceno y 60 de metanol y otra parte de metanol insaturado (pH de 2) con HCl gaseoso) y se calentó durante 20 minutos a 55 °C. Al final de la reacción, se adicionaron 2 ml de solución salina al 0.9 %. Para la extracción de ácidos grasos se adicionó 1 ml de hexano, agitándose vigorosamente durante 1 minuto, y se centrifugó a 2 500 rpm x 5 minutos para facilitar la separación de las fases. Se recuperó la fase orgánica superior, repitiéndose el procedimiento 3 veces, y se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno.

Para la aplicación al cromatógrafo de gases se resuspendió la muestra en volúmenes de 10 a 50 µl de hexano.

Para la identificación de los ácidos grasos de cadena larga, se realizó inicialmente un ensayo isotérmico a 180°C por 2 h con estándares de ácidos grasos C16, C18 y C20. Se procedió a la transformación logarítmica y a la extrapolación de los ácidos grasos de cadena larga. El coeficiente de correlación resultante de este análisis es de 1. Para el resto de ensayos, el cromatógrafo fue programado a 160 °C como temperatura inicial durante 1 minuto, con una elevación posterior de 20 °C por minuto hasta 240 °C y permaneciendo 3 minutos a la temperatura final. Las temperaturas del inyector y el detector fueron de 240°C. Los tiempos de salida de los picos de integración fueron comparados contra estándares conocidos (Sigma).

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

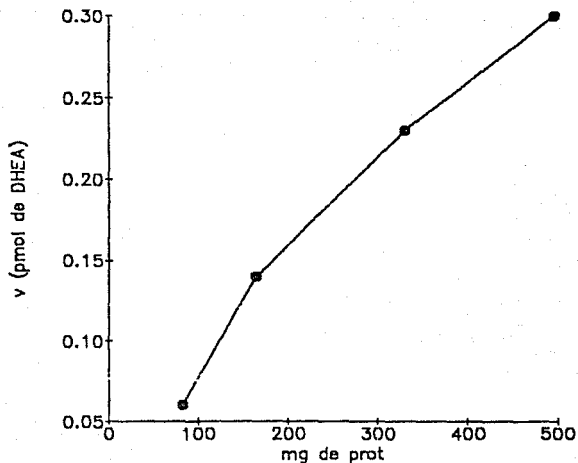
Para el análisis estadístico se utilizó el paquete epistat de IBM. Los valores fueron considerados como discontinuos. La prueba estadística utilizada fue la de Wilcoxon para grupos independientes. Cada dato obtenido fue considerado como individual para ser contrastado únicamente con su control correspondiente. Se consideró un nivel alfa de significancia de 0.05.

## RESULTADOS

### ACTIVIDAD DE LA SULFATASA ESTEROIDEA

#### CONDICIONES OPTIMAS DEL ENSAYO ENZIMATICO

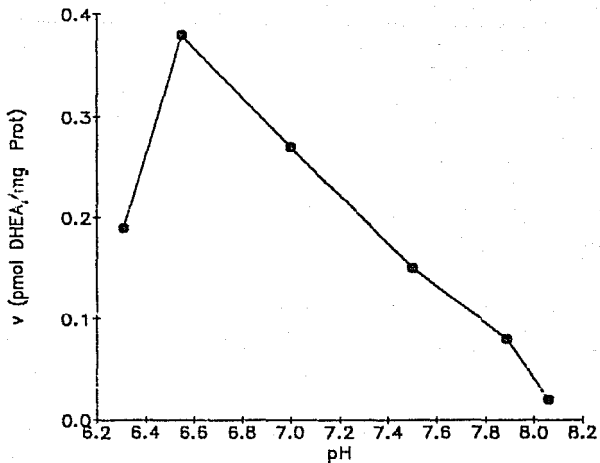
Para determinar las condiciones óptimas del ensayo enzimático, se trabajó con muestras de sangre de voluntarios sanos, bajo conocimiento de causa. El efecto de la concentración de proteína sobre la velocidad de la reacción se puede observar en la gráfica 1. Se trabajó con 5 muestras independientes con concentraciones distintas. Como se aprecia en la gráfica la velocidad es proporcional a la concentración de proteína. Cantidades mayores de proteínas, dentro de las utilizadas en el ensayo, presentan una mayor actividad de manera proporcional. La actividad específica del substrato corresponde a 16,000 cpm/pmol.



[DHEAS] 33 nM, pH 7.0, t 2h, 37°C, n=5.

Gráfica 1.- Efecto de la concentración de proteína de leucocitos sobre la velocidad de la reacción. Se observa un aumento proporcional en la velocidad conforme a la concentración de proteína. Valores expresados en media y DE.

El efecto del pH sobre la velocidad de la reacción se aprecia en la gráfica 2. Como en reportes anteriores, la actividad más alta se muestra entre los valores de pH de 6.5 y 7.0. En los valores de pH cercanos a 6.0 y 8.0 se observa una escasa actividad enzimática. Para la determinación enzimática se decidió trabajar con un pH de 7.0, el cual es un valor cercano a las condiciones fisiológicas y permite una detección adecuada de la actividad de la enzima.

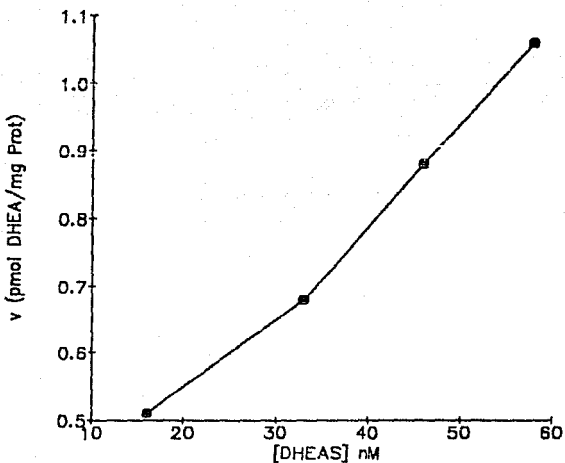


[DHEAS] 33 nM, t 2h, 37°C, n=5.

Gráfica 2.- Efecto del pH. La actividad más alta se aprecia entre los valores de pH 6.5 y 7.0. En los demás valores se observa una actividad menor. Valores expresados en media y DE.

El efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción se aprecia en la gráfica 3. Se aplicaron desde 14 nM hasta casi 60 nM de DHEAS-<sup>3</sup>H, esperando una transformación del 5 al 10 % con la menor utilización de marca posible y que nos permitiera distinguir la transformación esperada del sustrato. La actividad específica utilizada corresponde a 16,000 cpm/pmol. La

concentración seleccionada para el estudio fue de 33 nM, que equivale a 80,000 cpm por ensayo, aproximadamente.

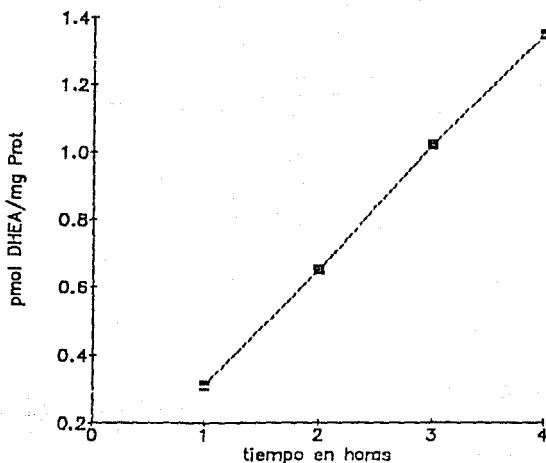


pH 7.0, t 2h, 37°C, n=5.

Gráfica 3.- Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción. Se observa una actividad lineal a diferentes concentraciones de DHEAS. La actividad específica es de 16,000 cpm/pmol. Valores expresados en media y DE.

En la gráfica 4 se muestra la relación de la actividad con el tiempo. El tiempo máximo de incubación fue de 4 horas. De igual forma, se buscaba el tiempo óptimo para distinguir

una actividad para la clasificación del grupo problema en la porción recta de la hipérbola. Para tal efecto, en el ensayo a 2 h se ve una clara transformación lineal del producto. Sin embargo, puede llevarse a cabo utilizando un tiempo de una hora. En el presente trabajo se optó por el ensayo a 2 h para una mayor claridad en la clasificación de los pacientes.

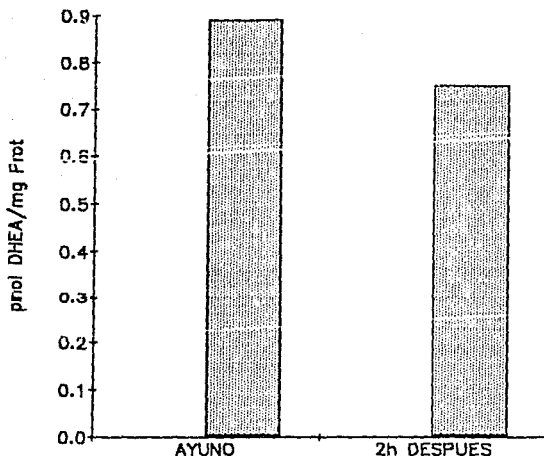


[DHEAS] 33 nM. pH 7.0, 37°C

Gráfica 4.- Velocidad de la reacción en relación al tiempo. Se ensayó a 4 h como tiempo máximo. En los tiempos establecidos se aprecia una reacción lineal. Valores expresados en media y DE.

Considerando la posibilidad de que al tomar la muestra el paciente podía no estar en ayunas, se determinó la actividad enzimática en personas en ayunas y a las mismas 2 h

después de haber ingerido alimentos. En la gráfica 5 se muestran los resultados de tal ensayo. Como puede apreciarse, aún cuando se observa una disminución en la actividad, no existen modificaciones importantes en ésta producidas por tal condición como para alterar la interpretación del ensayo.



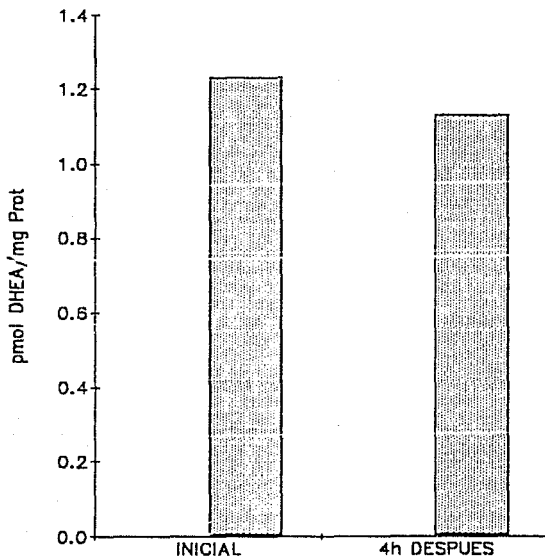
[DHEAS] 33 nM, pH 7.0, t 2h, 37°C

Gráfica 5.- Efecto del ayuno. Se tomó la muestra en ayunas y a los mismos testigos 2 h después de haber ingerido alimentos. Aunque se aprecia una disminución no es importante para la selección del grupo problema, ( $p > 0.05$ ). Valores expresados en media DE,  $n=4$ .

De igual forma, se determinó la actividad inmediatamente al tomar la muestra y 4 h después manteniéndola a temperatura ambiente, como puede apreciarse



en la gráfica 6, no existen modificaciones importantes bajo estas condiciones.

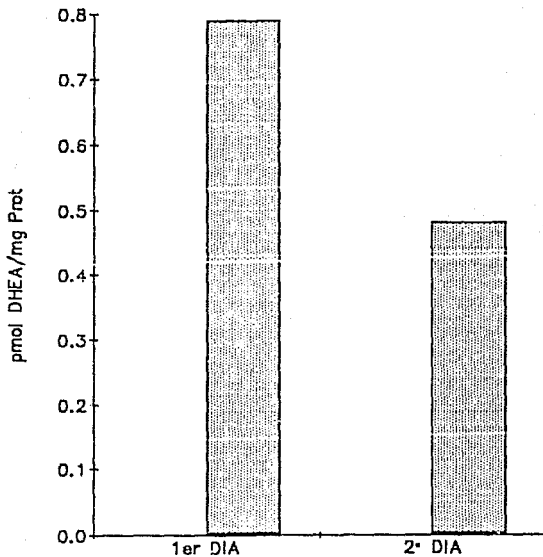


[DHEAS] 33 nM, pH 7.0, t 2h, 37°C

Gráfica 6.- Actividad enzimática de la muestra recién tomada y 4 h después mantenida a temperatura ambiente. Se puede apreciar que no existen modificaciones y que la actividad es prácticamente la misma, ( $p > 0.05$ ). Valores expresados en media y DE,  $n=4$ .

Asimismo, se mantuvo el homogenado de leucocitos a  $-4^{\circ}\text{C}$  y se procesó la muestra al día siguiente observándose una disminución en la actividad de casi el 50%, sin embargo, dichos cambios no son importantes para clasificar al grupo

problema (gráfica 7). En todo caso, debe considerarse este factor si se desea clasificar a portadoras.

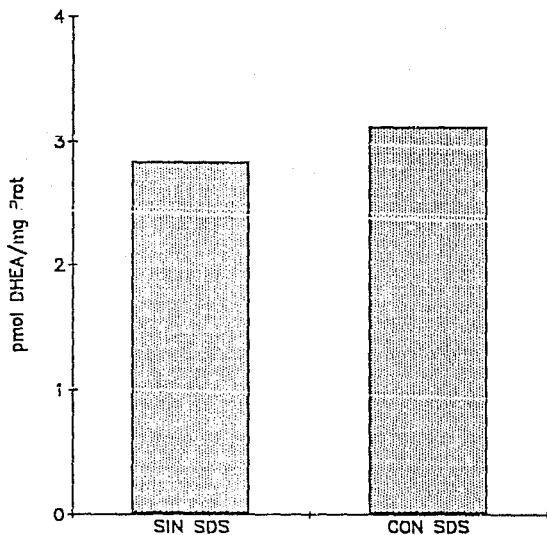


[DHEAS] 33 nM, pH 7.0, t 2h, 37°C

Gráfica 7.- Actividad del homogenado de leucocitos al día siguiente. Aunque la diferencia es casi del 50% ( $p < 0.001$ ), sigue estando presente la actividad para permitir el diagnóstico de los pacientes, bajo estas circunstancias. Valores expresados en media y DE,  $n=4$ .

Conociendo que la enzima se encuentra presente en la membrana microsomal, se consideró si era importante la utilización o no de detergentes que facilitaran su separación de ésta y permitieran la activación de la enzima.

En la gráfica 8 se aprecia una actividad similar en ambas condiciones, lo que nos indica que bajo ambos procedimientos puede llevarse a cabo la determinación, sin que afecte en la selección del grupo problema.

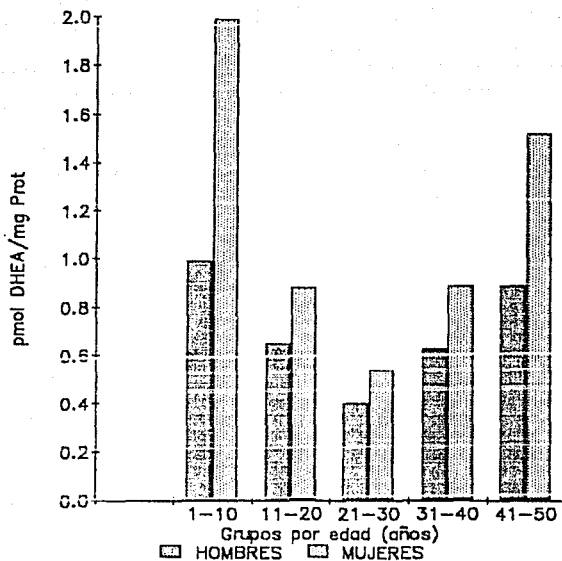


[DHEAS] 33 nM, pH 7.0, t 2h, 37°C

Gráfica 8.- La actividad no se modifica de manera importante con la presencia del detergente (p.0.05). Por lo que en ambas condiciones puede hacerse el ensayo enzimático para el diagnóstico de los pacientes. Valores expresados en media y DE, n=4.

La actividad enzimática determinada en diferentes grupos de edad se aprecia en la gráfica 9, los ensayos muestran separando a hombres y mujeres. La actividad siempre

es mayor en el sexo femenino, considerando la media, en todos los grupos de edad estudiados. En el cuadro 1 se encuentra la relación de la actividad enzimática entre la mujer y el hombre en diferentes grupos de edad.



[DHEAS] 33 nM, pH 7.0, t 2h, 37°C

Gráfica 9.- La actividad por edades presenta una variación según el grupo de edad. En la gráfica se observa una actividad mayor en los grupos de edades extremas. Prevalece siempre una mayor actividad en el sexo femenino en cualquier edad. Valores expresados en media y DE, la n se aprecia en el cuadro 1.

n

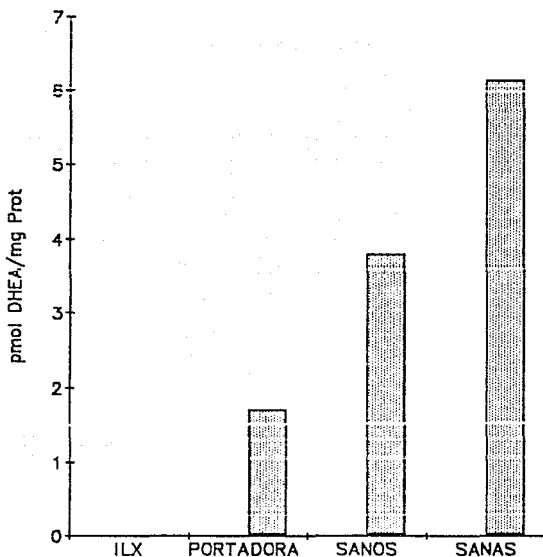
Grupo de edad	M	H	Relación M/H
1-10a	5	6	2.01
11-20a	5	3	1.35
21-30a	4	4	1.35
31-40a	4	4	1.41
41-50a	3	3	1.70

Cuadro 1.- Relación mujer/hombre de la actividad enzimática en los distintos grupos de edad. Se observa una relación M/H mayor en los grupos de edad extrema actividad. El grupo 1-10a, presenta una relación de 2:1 de la mujer con respecto al hombre. M=mujer, H=hombre.

#### ENSAYO PARA LA ASIGNACION DE LOS GRUPOS

Para la clasificación de la muestra problema, se seleccionaron inicialmente pacientes con diagnóstico probable de ILX, por clínica y árbol genealógico. Los pacientes presentaban escamas generalizadas y oscuras, en el más pequeño predominaban en abdomen. Uno de ellos no hablaba ni oía. Las edades eran de 4, 19, 22 y 70 años. Para corroborar el diagnóstico fue necesario la determinación de la actividad enzimática. En la gráfica 10 se aprecia la actividad de la SE mediante los niveles de transformación del substrato DHEAS-<sup>3</sup>H a su producto DHEA-<sup>3</sup>H. Los pacientes con ILX no presentan actividad detectable de la enzima con la metodología empleada. En la misma gráfica se puede observar el nivel de

actividad de portadoras obligadas, las cuales a pesar de su actividad menor, no llegan a presentar ninguna sintomatología. El nivel de actividad en los hombres sanos es más alto que el de las portadoras, los controles fueron pareados, por edad con el grupo problema, pero más bajo que el de las mujeres sanas (gráficas 9 y 10).



[DHEAS] 33 nM, pH 7.0, t 2h, 37°C

Actividad expresada en pmol/mg de proteína.

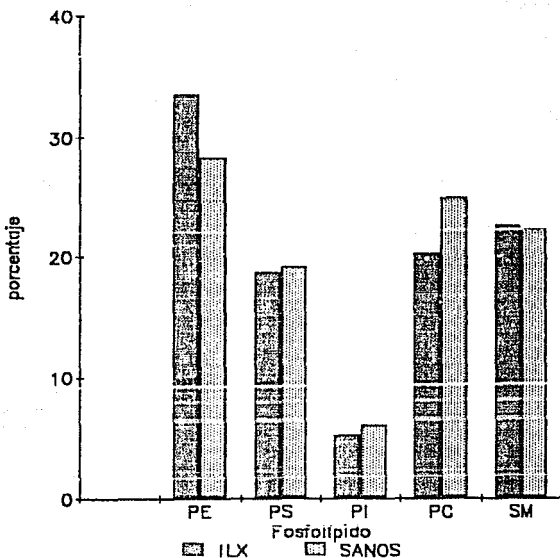
Gráfica 10.- Se pueden observar las distintas actividades presentadas en los grupos de estudio y en un grupo de portadoras obligadas. En el grupo problema no se aprecia actividad y en las portadoras se puede observar una disminución de ésta comparada con el de los controles sanos, incluso a los del sexo masculino. Valores expresados en media y DE. La n de ILX y controles fue hombres 4, de mujeres sanas 3 y de portadoras 7.

## DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS

Sobre el extracto total de lípidos de eritrocitos se realizó la separación por TLC. El sistema de solventes seleccionado de cloroformo/metanol/ácido acético/agua 25:15:3.6:2 (v/v/v/v), nos permite una clara distinción entre los grupos problema y los controles, ya que este sistema separa adecuadamente el SC del resto de los fosfolípidos (el  $R_f$  para cada compuesto se puede observar en el cuadro 2). En el primer grupo se aprecia la banda de SC cercana a la migración de PE, la cual está ausente en el grupo control. La separación menos detallada se presenta en las bandas de PI y PS, sin embargo, la densitometría distingue entre las dos. En la gráfica 11 se detallan los valores relativos encontrados para cada fosfolípido. Para considerar a éstos, se excluyó la cuantificación reportada para el SC, considerándose como 100% exclusivamente a los fosfolípidos. Los valores indican un aumento en la composición relativa de PE ( $p < 0.05$ ) con una disminución paralela de la PC ( $p < 0.05$ ). Considerando que ambos valores son relativos, se espera que ante los cambios de un compuesto, exista paralelamente otra modificación, como la que se observa en este caso. En el resto de los fosfolípidos no hubo modificaciones significativas.

Lípido	Rf
PE	0.78
SC	0.72
PS	0.68
PI	0.64
PC	0.45
SM	0.24

Cuadro 2.- Valores de Rf (Factor de retención) para cada uno de los lípidos.



Gráfica 11.- Composición relativa de los fosfolípidos.\*PE y PC muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).Valores expresados en porcentajes y en media y DE.



## DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS

En el cuadro 3 se observan las concentraciones relativas de ácido grasos en los grupos problema y control, así como la relación ácidos graso insaturado/saturado. La mayoría de ellos no presentan diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en los pacientes con ILX no se detectan ácidos grasos de cadena larga como C20, C22, C22:6 y C24, aunque la concentración es relativamente baja en el grupo control. Por lo que respecta a C 18:2 y C 18:3, tampoco existen en estos pacientes, aunque cabe considerar nuevamente, que la concentración relativa en el grupo control es muy baja. Por lo que respecta a C16:2, su composición relativa es mayor en el grupo problema que en los sanos ( $p < 0.05$ ). No se encontraron modificaciones en la relación ácido graso saturado/insaturado comparando ambos grupos.

AC. GR	ILX	SANOS
C16	18.96± 2.34	17.30± 1.14
C16:1	0.99± 0.41	1.09± 0.15
C16:2*	0.25± 0.07	0.10± 0.07
C18	31.80± 2.15	29.71± 1.16
C18:1	14.13± 2.34	13.22± 1.59
C18:2**	- - - - -	0.23± 0.05
C18:3**	- - - - -	0.23± 0.17
C20**	- - - - -	0.53± 0.19
C20:4	19.38± 1.34	17.84± 1.40
C20:5	0.49± 0.11	0.51± 0.08
C22	- - - - -	0.20± 0.15
C22:4	4.78± 0.49	3.88± 0.64
C22:5	7.00± 0.55	7.20± 0.91
C22:6	- - - - -	0.19± 0.08
C24	- - - - -	2.29± 1.96
Relación ac.gr. saturado/insaturado	99.78	99.07.

Cuadro 3.- Composición relativa de los ácidos grasos expresada con media y desviación estándar. Las líneas discontinuas indican la ausencia del ácido graso. \*En C16:2 existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Valores expresados en porcentajes y en media y DE. \*\*En 1 paciente se encontraron trazas de C18:2, C18:3 y C20.

## DISCUSION

En los últimos años, a raíz de los conocimientos sobre el aumento en la concentración de SC en los pacientes con ILX, se han buscado los procesos metabólicos en los que éste participa, así como las modificaciones en la composición de los demás lípidos en esta enfermedad. La búsqueda inicial se ha dirigido sobre las regiones en las cuales las alteraciones, como producto del acúmulo de SC, presentan sintomatología clínica. Aún cuando son varias las poblaciones celulares afectadas, el enfoque principal ha sido en piel. El interés por esta región se explica por el intento de conocer los posibles mecanismos de regulación en el proceso de descamación que ocurre normalmente en la piel, así como el de describir más adecuadamente los cambios en la totalidad de los lípidos comprometidos en este órgano. A pesar de que en la ILX únicamente se presenta una alteración génica que afecta a la SE, los cambios reportados hasta el momento no se limitan a la acumulación del substrato de esta enzima, sino también a otro tipo de lípidos no relacionados aparentemente. En piel, además del aumento del SC, existe una disminución en la composición relativa de esteroides libres y lípidos neutros<sup>(24)</sup>. Los autores postulan que la regulación en el proceso de descamación requiere de una correcta interacción entre los distintos tipos de lípidos, que permitan un adecuado mecanismo de cohesión y descamación. De igual forma, se han reportado cambios en la composición de las LDL<sup>(38)</sup>,

consistentes en un aumento en la concentración de triacilgliceroles y una disminución de los ésteres de colesterol. La conclusión del estudio menciona que no hay explicación todavía satisfactoria para entender este tipo de cambios en la composición de lípidos, sin embargo las modificaciones en los lípidos se han observado en distintos padecimientos.

Por otra parte, los estudios *in vitro* que directamente han encontrado funciones del SC mencionan que aumenta la incorporación de ácidos grasos a diacilgliceroles, triacilgliceroles y fosfolípidos<sup>(34)</sup> y que inhibe la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa<sup>(35)</sup>, enzima clave en la regulación de la síntesis de colesterol endógeno. Otros refieren que estabiliza la membrana<sup>(36)</sup> y que es producto de excreción<sup>(33)</sup>.

En el presente trabajo, describimos más cambios de los presentes en la ILX, además de los ya reportados<sup>(24,26,37,38)</sup>. Conociendo que los lípidos del eritrocito son en su mayoría fosfolípidos y que en esta célula también existe una acumulación del SC se decidió utilizarla como población de estudio. En los resultados encontramos que las modificaciones no son exclusivas al aumento del SC, sino que también lípidos como la PE y la PC presentan cambios en su composición relativa, la primera incrementa y la segunda disminuye. El por qué de estos cambios podría intentar explicarse si consideramos las características que le confiere el aumento del SC a la

célula. Dicha condición origina una mayor estabilidad y resistencia a soluciones hipotónicas de la membrana<sup>(36)</sup>. No existe una traducción clínica como resultado de esta alteración metabólica, sin embargo, los cambios encontrados en el presente estudio podrían indicarnos que se trata de un mecanismo de compensación celular ante la presencia de las cantidades crecientes de SC. Aunado a estas modificaciones de los fosfolípidos más abundantes, también se encuentran cambios en la composición relativa de ácidos grasos. Existe una menor incorporación de los ácidos grasos de cadena larga y una mayor incorporación de un insaturado que es C16:2. Lo que también podría hablarnos de un intento de compensación por parte del eritrocito ante el efecto producido por el SC, aunque cabe mencionar que C18:2 y C18:3 no se encuentran presentes en la ILX y sí en los controles. En este apartado es conveniente mencionar que existe una serie de padecimientos en donde se han reportado modificaciones en la composición de los ácidos grasos<sup>(42-48)</sup>, sin ser necesariamente la causa primaria de afectación. La composición alterada de los ácidos grasos de la membrana se traduce en una modificación de su fluidez con cambios en sus propiedades. Dicha fluidez es afectada de manera importante por la presencia de los ácidos grasos insaturados y del colesterol<sup>(63)</sup>. En este estudio, aunque existen modificaciones en la composición de los ácidos grasos, la relación ácido graso saturado/insaturado no se altera. Por lo que consideramos que en los pacientes no existe tal

alteración. Sin embargo, el incremento de SC probablemente pudiera afectar en algún grado la fluidez de la membrana.

Por la dificultad que esto representa, la posibilidad de que factores dietéticos influyan en las modificaciones aquí presentadas no puede excluirse<sup>(64)</sup>. Con el propósito de controlar este factor, nosotros utilizamos controles de la misma familia y edad. Además, durante el proceso de estandarización de la técnica, analizamos muestras de pacientes sanos y desnutridos (niños) en donde no encontramos diferencias estadísticamente significativas. De cualquier forma, el factor dietético debe tenerse en consideración.

Por otro lado, creemos que todas estas modificaciones observadas en el presente estudio, aunque estadísticamente significativas, no son lo suficientemente grandes como para condicionar una alteración clínicamente importante en estos pacientes, ya que no presentan manifestaciones en esta línea.

Ante todos los cambios reportados anteriormente, es posible considerar que los distintos lípidos se comportan integrándose como una unidad. Y que los cambios parciales puede condicionar modificaciones de los demás componentes, simplemente por el hecho de cambiar uno de ellos. Con el presente estudio este concepto no puede aclararse, sin embargo, surge la alternativa de saber si realmente ésto puede ser factible con la posibilidad de los estudios *in vitro*.

De una manera más específica, resulta difícil explicar el por qué precisamente la PE y la PC presentan estos

cambios. Ambos son los fosfolípidos más abundantes de la membrana del eritrocito, y es posible que por esta característica, sean los más afectados. La diferencia entre ambos químicamente consiste en la presencia de 3 radicales metilo terminales en el grupo amino de la PE. Esto confiere un mayor tamaño, aunque discreto, de su estructura molecular. Produciendo quizás una interacción espacial inadecuada ante la presencia del aumento del SC y por tanto su composición relativa se vea disminuida, sin embargo, ésto no puede aseverarse con el diseño propuesto en el presente estudio. Cabe mencionar que existe la alternativa del diseño de liposomas para corroborar el efecto producido por el SC en la composición de los fosfolípidos y ácidos grasos.

Por otro lado, ante la dificultad del diagnóstico de estos pacientes, que ha requerido la utilización de compuestos marcados y todas las características que esto trae consigo, es factible realizarlo de una manera más sencilla utilizando la muestra de sangre para la identificación del SC. Dentro de los procesos de estandarización de técnicas para encontrar el mejor método de separación de fosfolípidos, se observó que la separación por TLC con el sistema de solventes utilizado permite una visualización correcta del SC de manera independiente de los demás componentes lipídicos. Esto constituye una buena herramienta para el diagnóstico, ya que la muestra de sangre se obtiene fácilmente y el procedimiento de separación y visualización por TLC no

requiere ni de los costos, ni presenta las dificultades de la utilización de compuestos marcados.

Por otro lado, las características encontradas en la actividad enzimática corresponden a lo reportado previamente en la literatura<sup>(22)</sup>. La actividad máxima se presenta entre los valores de pH de 6.5 y 7.0 y el sexo femenino presenta una mayor actividad. Ante esta tendencia de una mayor actividad en el sexo femenino, es conveniente recordar que el gen que codifica para esta enzima, se encuentra ubicado en el cromosoma X<sup>(11)</sup>. Desde hace tiempo, se sabe que el cromosoma X, en mamíferos, presenta un proceso de inactivación (que le confiere una inactividad génica) resultando en una cantidad igual de productos génicos en la mujer (XX) y en el hombre (XY)<sup>(65)</sup>. Existe evidencia de un centro de inactivación que participa en este proceso<sup>(66)</sup>. De manera interesante, se ha encontrado un gen (XIST, de X inactive specific transcripts), ubicado en esta región, que se encuentra activo en el cromosoma X inactivo y contrariamente, inactivo en el X activo<sup>(67)</sup>. Probablemente, el gen XIST está muy estrechamente relacionado con el proceso de inactivación del cromosoma X y quizás pronto permita el conocimiento en el mecanismo de este proceso.

Se ha reportado que algunos genes escapan a este proceso de inactivación<sup>(66)</sup>, y entre ellos se encuentra el gen que codifica para la SE. A pesar de esto, la actividad de la SE en hombres y mujeres no refleja las diferencias entre ambos en el número de cromosomas X<sup>(68)</sup>. En reportes previos,



la relación es mayor a 1 pero menor de 2, la que correspondería si todos los loci de la SE en el cromosoma X fueran expresados en la misma forma. Se ha tratado de explicar ésto realizando estudios en células híbridas, en donde se observa una menor actividad de la SE en el cromosoma X inactivo<sup>(68)</sup>. Posiblemente, la influencia de genes vecinos inactivos (sujetos al proceso de inactivación) producen la expresión reducida del locus de la SE, como se ha observado en genes autosómicos cuando están próximos a la cromatina X inactiva<sup>(69)</sup>.

En nuestro estudio, la relación de los grupos de edad de 11 años en adelante es muy parecida a los reportes previos<sup>(1)</sup>. Sin embargo, nuestro grupo de edad de 1-10 años, no reportado previamente, presenta una relación de 2:1 mujer/hombre en la actividad de la SE, probablemente por factores de origen hormonal. La realización de estudios posteriores podrán dar explicación a este hallazgo.

La ILX es una entidad que llega a presentar dificultad en el diagnóstico diferencial con la ictiosis vulgar autosómico dominante (IV), aún cuando las bases en las dos enfermedades son diferentes, y en la IV no se han reportado cambios en la composición de lípidos sino más bien de origen proteico<sup>(70)</sup>. Considerando el problema diagnóstico en estas dos entidades, la determinación enzimática ofrece una alternativa para el diagnóstico de estos pacientes, ya que éste puede realizarse sin tantas condiciones por parte del paciente. La muestra puede guardarse a temperatura ambiente

por varias horas o congelarse el homogenado para su determinación al día siguiente sin que la detección de la actividad enzimática en los pacientes se vea afectada. Asimismo, la condición de ayuno del paciente no es necesaria para su diagnóstico. De igual forma, cabe considerar, que aunque únicamente se incluye como parte de la estandarización de la técnica, existe una variación en la actividad de los grupos en las distintas edades clasificadas. De este modo, los grupos extremos son los que presentan una actividad mayor. Aún cuando no forma parte del trabajo, este hallazgo puede establecer una alternativa de estudio para tratar de encontrar si realmente existe una diferencia entre las distintas edades y el por qué de esta diferencia.

## CONCLUSION

En el presente trabajo, encontramos modificaciones en la composición de lípidos del eritrocito en la ILX consistentes en aumento de PC y disminución de PE, así como ausencia de los ácidos grasos C20, C22, C24, C18:2, C18:3 y C22:6. Con el presente modelo de estudio no podemos explicar correctamente el por qué de estos cambios. Consideramos que se trata simplemente de una alteración de arreglo en los lípidos de la membrana del eritrocito a causa del aumento en la concentración del SC, puesto que los componentes afectados son minoritarios en su composición porcentual y el coeficiente ácido graso saturado/insaturado no se ve afectado. Esto nos indicaría de manera indirecta que no existe una alteración en la fluidez de la membrana. Todo esto aunado a que los pacientes no presentan alteraciones clínicas por estas modificaciones. Por otro lado, encontramos una relación mujer/hombre de la actividad de la SE del doble únicamente en los niños, lo que nos hace pensar que probablemente esté presente otro factor o factores regulando la actividad de la SE o la expresión del gen, quizás de tipo hormonal.

B I B L I O G R A F I A

ESTA TESIS HA DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 1.- Schnyder W.- Inherited Ichthyoses. Arch Derm 1970;102:240-52.
- 2.- Kerr CB, Wells RS. Sex linked ichthyoses. Ann Hum Genet 1965;29:33-50.
- 3.- Andria A, Ballabio G, Parenti S, DiMaio, Piccirillo A. Steroid sulphatase deficiency and hypogonadism. Eur J Pediatr 1984;142:304-5.
- 4.- Unamuno P, Martin C, Fernandez E. X-linked Ichthyoses and Cryptorchidism. Dermatologica 1986;172:326-9.
- 5.- Perrin JC, Idemoto JY, Sotos JF, Maurer WF, Steinberg AG. X-linked Syndrome of Congenital Ichthyosis, Hypogonadism, Mental Retardation and Anosmia. Birth Defects 1976;XII(5):267-74.
- 6.- Sever RJ, Frost P, Weinstein G. Eye changes in ichthyosis. JAMA 1968;206:2283-6.
- 7.- Shapiro LJ, Weiss R. X-linked ichthyosis due to steroid-sulphatase deficiency. Lancet 1978;14:70-2.
- 8.- Shapiro LJ, Roberta W, Buxman M, Vidgoff J, Dimond RL. Enzymatic basis of typical X-linked ichthyosis. Lancet 1978;7:7567.
- 9.- France JT, Liggins GC. Placental sulfatase deficiency. J Clin Endocr 1969;29:138-41.
- 10.- France JT. Steroid sulfatase deficiency. J Steroid Biochem 1979;11:647-51.

- 11.- Muller C, Walhstrom J, Rogers H. Further evidence for the assignment of steroid sulfatase X-linked ichthyosis locus to the telomere of Xp. Hum Genet 1981;58:446.
- 12.- Bonifas JM, Morley BJ, Oakey RE, Waikon Y, Epstein EH. Cloning of cDNA for steroid sulfatase: frequent occurrence of gene deletions in patients with recessive X-chromosome-linked ichthyosis. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:9248-51.
- 13.- Brunhilde W, Merriman FH, Neugebauer M et al. Linkage analysis in X-linked ichthyosis (steroid sulfatase deficiency). Hum Genet 1988;80:191-2.
- 14.- Dolly JO, Dodgson KS, Rose FA. Studies on the oestrogen sulphatase and arylsulphatase C activities of rat liver. Biochem J 1972;128:337-45.
- 15.- Chang PL, Peter AV, Rosa NE, Mohammed A, Davidson RG. Association of Steroid Sulfatase with One of the Arylsulfatase C Isozymes in Human Fibroblasts. J Biol Chem 1986;261(31):14443-7.
- 16.- Chang PL, Mueller OT, Lafrenie RM et al. The Human Arylsulfatase-C Isozymes: Two Distinct Genes That Escape from X Inactivation. Am J Hum Genet 1990;46:729-37.
- 17.- Burstein S, Dorfman RI. Determination of Mammalian Steroid Sulfatase with 7 alpha-<sup>3</sup>H-beta-Hydroxyandrost-5-en-17-ona Sulfate. J Biol Chem 1963;238(5):1656-60.
- 18.- Chibbar R, Hobkirk, Mitchell BF. Sulfohydrolase Activity for Estrone Sulfate and Dehydroepiandrosterone Sulfate in Human Fetal Membranes and Decidua around the Time of Parturition. J Clin Endocr Metabol 1986;62(1):90-4.

- 19.- Milewich L, Porter JC. *In Situ* Steroid Sulfatase Activity in Human Epithelial Carcinoma Cells of Vaginal, Ovarian, and Endometrial Origin. *J Clin Endocr Metabol* 1987;65(1):164-9.
- 20.- Chibbar R, Mitchell BF. Steroid Sulfohydrolase Activity in Human Chorion: I. Interactions of other Steroids with Estrone Sulfate as Substrate. *J Clin Endocr Metabol* 1988; 66(6):1192-6.
- 21.- Macindoe JH, Woods G, Jeffries L, Hinkhouse M. The Hydrolysis of Strong Sulfate and Dehydroepiandrosterone Sulfate by MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Endocr* 1988; 123(3):1281-7.
- 22.- Klein H, Molwitz T, Bartsch W. Steroid sulfatase in human benign prostatic hyperplasia: Characterization and quantification of the enzyme in epithelium and stroma. *J Steroid Biochem* 1989;33(2):195-200.
- 23.- Hobkirk R. Steroid sulfotransferases and steroid sulfate sulfatases: characteristics and biological roles. *Can J Biochem Cell Biol* 1985;63:1127-44.
- 24.- Williams MI, Elias PM. Stratum Corneum Lipids in Disorders of Cornification. *J Clin Invest* 1981;65:1404-10.
- 25.- Lin YN, Horowitz ML. Enzymatic sulfation of cholesterol by rat gastric mucosa. *Steroids* 1980;26:697-708.
- 26.- Elias PM, Williams ML, Maloney ME. Stratum Corneum Lipids in Disorders of Cornification. *J Clin Invest* 1984;74:1414-21.

- 27.- Kooyman JD. Lipids of the skin. Some changes in the lipids of the epidermis during keratinization. Arch Dermatol 1932;25:444-50.
- 28.- Lampe M, Williams M, Elias P. Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. J Lipid Res 1983;24:131-40.
- 29.- Elias PM, Brown BE, Fritsch PO, Goerke RJ, Gray GM White RJ. Localization and composition of lipids in neonatal mouse stratum granulosum and stratum corneum. J Invest Dermatol 1979;73:339-48.
- 30.- Iwamori M, Moser HW, Kishimoto Y. Cholesterol sulfate in rat tissues. Biochem Biophys Acta 1976;441:268-79.
- 31.- Roberts KD, Bandi L, Calvin HI, Drucker WD, Lieberman S. Evidence that steroid sulfates serves as biosynthetic intermediates IV. Conversion of cholesterol sulfate *in vivo* to urinary C19 and C21 steroidal sulfates. Biochem 1964;3:1983-8.
- 32.- Lalumiere G, Bleau G, Chapdelaine A, Roberts KD. Cholesteryl sulfate and sterol sulfatase in the human reproductive tract. Steroids 1976;27:247-60
- 33.- Moser HW, Moser AB, Orr JC. Preliminary observations on the occurrence of cholesterol sulfate in man. Biochim Biophys Acta 1966;116:146-55.
- 34.- Williams ML, Rutherford SL, Feingold KR. Effects of cholesterol sulfate on lipid metabolism in cultured human keratinocytes and fibroblasts. J Lipid Res 1987;28:955-66.
- 35.- Williams ML, Hughes-Fulford M, Elias PM. Inhibition of

- 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and sterol synthesis by cholesterol sulfate in cultured fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1985;845:349-57.
- 36.- Bleua G, Lalumiere G, Chapdelaine A, Kenneth DR. Red Cell surface structure. *Biochim Biophys Acta* 1975;375:220-3.
- 37.- Epstein EH, Krauss RM, Shackleton CH. X-linked Ichthyosis: Increased Blood Cholesterol Sulfate and Electrophoretic Mobility of Low-Density Lipoprotein. *Science* 1981;214(6): 659-60.
- 38.- Nakamura T, Matsuzawa Y, Okano M et al. Characterization of low-density lipoproteins from patients with recessive X-linked ichthyosis. *Atherosclerosis* 1988;70:43-52.
- 39.- Ways P, Hanahan DJ. Characterization and quantification of red cell lipids in normal man. *J Lipid Res* 1964;5:318-28.
- 40.- Shohet SB. Red cell membrane lipids: renewal and metabolism. *Williams. Hematology*, 1977:190-6.
- 41.- Lux SE. Dissecting the red cell membrane skeleton. *Nature* 1979;281:426-9.
- 42.- Toshihiro H, Hiroaki F, Masayasu S et al. Fatty Acid composition of platelet phospholipids and plasma total in Kawasaki disease. *Acta Paediatr JPN* 1988;30:294-98.
- 43.- Vajreswari A, Narayanareddy, Srinivasa R. Fatty acid composition of erithrocyte membrane lipid obtained from children suffering from Kwashiorkor and Marasmus. *Metabolism* 1990;39(8):779-82.
- 44.- Tilvis RS, Miettinen TA. Fatty acid composition of serum



- lipids, erythrocytes, and platelets in insulin-dependent diabetic womwn. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:741-5.
- 45.- Kutty KM, Guha AK, Chandra RK et al. A study of erythrocyte fatty acids, adenosine triphosphatase and acetyl cholinesterase in cystic fibrosis. *Clin Biochem* 1979;12: 98-9.
- 46.- Tsuji S, Suzuki M, Ariaga T et al. Abnormality of long chain fatty acids in erythrocyte membrane sphingomyelin from patients with adrenoleukodystrophu. *J Neurochem* 1981; 36:1046-9.
- 47.- Schwarz KB, Larroya S, Kohlman L, Morrison A. Erythrocyte lipid abnormalities in Reye's syndrome. *Pediat Res* 1987; 21(4):352-6.
- 48.- Shohet SB. Release of phospholipid fatty acid from human erythrocyte. *J Clin Invest* 1970;49:1668-78.
- 49.- Ting A, Morris PJ. A technique for Lymfocyte Preparation from Stored Heparinized Blood. *Vox Sang* 1971;20:561-3.
- 50.- Metcalf JAQ, Coallin. Preparation of cells and Materials for Functional Assays. In. Raven Press eds. *Laboratory Manual of Neutrophil Function*. New York 1982:2-10.
- 51.- Boyum A. Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21(97):77-91.
- 52.- Nitsch M, Gabruelecic D, Tschesche H. Separation of Granule Subpopulations in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Biol Chem* 1990;371:611-5.
- 53.- Epstein EH, Leventhal ME. Steroid Sulfatase of Human

- Leukocytes and Epidermis and the Diagnosis of Recessive X-linked Ichthyosis. J Clin Invest 1981;67:1257-62.
- 54.- Peuchant E, Wolff R, Salles C, Jensen R. One-Step Extraction of Human Erythrocyte Lipids Allowing Rapid Determination of Fatty Acid Composition. Anal Biochem 1989; 181:341-4.
- 55.- Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem 1976;72: 248-54.
- 56.- Skipski VP, Peterson RF, Barclay M. Quantitative Analysis of Phospholipids by Thin-Layer Chromatography. Biochem J 1964;90:374-8.
- 57.- Tsuchiya Y, Suagi H. The effect of *Mycoplasma pneumoniae* infection on Human Erythrocytes: Changes in Osmotic Fragility, Lipid Composition, Sialic Acid Content,  $Ca^{2+}$ -ATPase Activities, and ATP Concentration. Biochem Medicine 1982;28:256-65.
- 58.- Goppelt M, Resh K. Densitometric Quantitation of Individual Phospholipids from Natural Sources separated by One-Dimensional Thin-Layer Chromatography. Anal Biochem 1984;140:152-6.
- 59.- Marcheselli V, Bazan NG. Quantitative analysis of fatty acids in phospholipids, diacylglycerols, free fatty acids, and other lipids. J Nutr Biochem 1990;1:382-8.
- 60.- Almong R, Anderson-Samsonoff C, Berns DS, Saulsbery R. A

- Methodology for Determination of Phospholipids. Anal Biochem 1990;188:237-42.
- 61.- Kishiro K, Yasuda H. A Reliable Analysis of Tissue Free Acids by Gas-Liquid Chromatography. Anal Biochem 1988;175: 516-20.
- 62.- Lohninger A, Preis P, Linhart L, Sommoggy SV, Landau M, Kaiser E. Determination of Plasma Free Fatty Acids, Free Cholesterol, Cholesterol Esters, and Triacylglycerols Directly from Total Extract by Capillary Gas Chromatography Anal Biochem 1990;186:243-50.
- 63.- Shinitzky M, Henkart P. Fluidity of cell membranes- Current concepts and trends. Int Rev Cytol 1979;60:121-47.
- 64.- Lopes S, Trimbo S, Mascioli E, Blackburn G. Human plasma fatty acid variations and how they are related to dietary intake. Am J Clin Nutr 1991;53:628-37.
- 65.- Grant SG, Chapman VM. Mechanism of X-chromosome regulation. Ann Rev Genet 1988;22:199-233.
- 66.- Gartler S. Mammalian x-chromosome inactivation. Ann Rev Genet 1983;17:155-90.
- 67.- Brown C, Ballabio A, Rupert J et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. Nature 1991; 349:38-44.
- 68.- Migeon B, Shapiro L, Norum R, Mohandas T, Axelman J, Dabora R. Differential expression of steroid sulphatase locus on active and inactive human X chromosome. Nature 1982;299:938-40.

- 69.- Mohandas T, Sparkes RS, Bishop DF, Desnick RJ, Shapiro LJ.  
Frequency of reactivation and variability in expression of  
X-linked enzyme loci. Am J Hum Genet 1984;36:916-25.
- 70.- McKusick VA. Mendelian inheritance in man. 6th ed John  
Hopkins University press. 1988.