

11262

11
2es-



Universidad Nacional Autónoma
de México

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

"COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE SULFATASA
DE ESTEROIDES EN PACIENTES CON ISOCROMOSOMA
DE BRAZOS LARGOS DEL CROMOSOMA X CON
PACIENTES CON MONOSOMIA DEL CROMOSOMA X
Y MUJERES NORMALES"

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A :

ANTONIO MIRANDA DUARTE

MEXICO, D. F.

1998



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264420



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

Subdivisión de Maestrías y Doctorados

Of. No. 313/EJG/MEMK/VIII/97.

DR. ENRIQUE PIÑA GARZA
Director General de Estudios
de Posgrado, U.N.A.M.
Presente

Informo a usted que el (la) C. ANTONIO MIRANDA DUARTE
aspirante al grado de MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS
con la tesis titulada "Comparación de la actividad de sulfatasa de esteroides
en pacientes con isocromosoma de brazos largos del cromosoma X con
pacientes con monosomía del cromosoma X y mujeres normales"

será examinado (a) en el aula de exámenes de grado "Dr. Luis Castelazo Ayala" (Edificio de la
Unidad de Posgrado, primer piso, costado sur de la Torre II de Humanidades) por el jurado
constituido por los siguientes sinodales:

PRESIDENTE:	DR. FABIO SALAMANCA GOMEZ
SECRETARIO:	M.C. MARISOL LOPEZ LOPEZ
PRIMER VOCAL:	DRA. SUSANA KOFMAN-ALFARO (TUTOR)
SEGUNDO VOCAL:	M.C. SERGIO CUEVAS COVARRUBIAS
TERCER VOCAL:	DR. JUAN CUAUHEMOC DIAZ ZAGOYA
SUPLENTE:	DRA. DOLORES SAAVEDRA ONTIVEROS
SUPLENTE:	DR. MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA

En cumplimiento con los Artículos 18 y 19 del Capítulo I, Título II, del Reglamento General de
Estudios de Posgrado de la U.N.A.M.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D. F., a 12 de agosto de 1997.

Vo. Bo.

DR. HUGO ARECHIGA U.
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación

Vo. Bo.

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA.
Director de la Facultad
de Medicina.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

SEDE CENTRO

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO S. Sa.

UNIDAD DE GENETICA

"COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE SULFATASA DE ESTEROIDES EN
PACIENTES CON ISOCROMOSOMA DE BRAZOS LARGOS DEL CROMOSOMA X
CON PACIENTES CON MONOSOMIA DEL CROMOSOMA X Y MUJERES
NORMALES"

ALUMNO: ANTONIO MIRANDA DUARTE

ASESORES: DRA. SUSANA KOFMAN

DR. SERGIO CUEVAS

Para mi esposa Ivonne y nuestra hija Ivana

Con todo mi amor

INDICE

RESUMEN.	2
SUMMARY.	3
ANTECEDENTES	4
1. Esteroides sulfatados	4
2. Arilsulfatasas	7
3. Sulfatasa de esteroides	9
4. Inactivación del cromosoma X y la STS.	11
5. Actividad enzimática de la STS	17
6. Síndrome de Turner	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
PROBLEMA	24
HIPOTESIS.	25
OBJETIVOS.	26
MATERIAL Y METODOS	27
TAMAÑO DE MUESTRA.	32
METODOS ESTADISTICOS	32
PROCEDIMIENTOS	33
RESULTADOS	39
DISCUSION	45
BIBLIOGRAFIA	54
ANEXOS	63

RESUMEN

La enzima sulfatasa de esteroides (STS) cataliza la hidrólisis del grupo sulfato en los 3- β hidroxiesteroides. El gen se localiza en Xp22.3 y escapa al proceso de inactivación del cromosoma X. Las mediciones de la actividad de la STS en varones y mujeres no reflejan las diferencias en el número de cromosomas X, siendo la relación menor a la esperada 2:1, sugiriendo inactivación parcial del gen STS. En fibroblastos la actividad de la STS en alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma X con una sola copia del gen, es similar a la de varones y menor a la de mujeres normales. En este trabajo se comparó la actividad de la STS en leucocitos de pacientes con isocromosoma de brazos largos del cromosoma X [46,X,i(Xq)] y monosomía del cromosoma X (45,X) con controles femeninos sanos, para conocer si existe variación en la actividad enzimática en estas alteraciones dependiendo de la línea celular. Se estudiaron 6 pacientes de cada grupo y se midió la actividad enzimática de la STS en leucocitos mediante la conversión de sulfato de dehidroepiandrosterona (7-[³H]-DHEA-S) a 7-[³H]-DHEA. La actividad media en pacientes con 46,X,i(Xq) fue de 1.12 ± 0.18 pmol/mg prot/h, en 45,X de 1.06 ± 0.19 pmol/mg prot/h y en los controles de 0.94 ± 0.12 . Los resultados se analizaron con la prueba de U de Mann-Whitney obteniendo una $p > 0.05$. No se encontraron diferencias significativas entre las alteraciones del cromosoma X y los controles probablemente debido a que en leucocitos la expresión de la STS es diferente que en fibroblastos.

SUMMARY

Steroid sulfatase (STS) enzyme catalyses the hydrolysis of the 3β -hydroxysteroid sulfates. STS gene is on Xp22.3 and escapes to the X-chromosome inactivation process. Nevertheless measurements of STS activity in males and females do not accurately reflect the differences in number of X-chromosomes. The female/male ratio of STS activity mean values is less than 2:1, this suggests a partial X-chromosome inactivation of STS gene. STS activity in fibroblasts shows a partial correlation in numerical and structural X-chromosomes aberrations. This data is compatible to that found in relation to the normal males and females. In this study, STS activity was compared in leukocyte of long arm X-isochromosome [46,X,i(Xq)] and X-chromosome monosomy (45,X) with normal females controls, to know the STS activity in these aberrations. Six subjects in each group were included, leukocyte STS activity was determined by desulfation of dehydroepiandrosterone sulfate ($7\text{-}[^3\text{H}]\text{-DHEAS}$) to $7\text{-}[^3\text{H}]\text{-DHEA}$. The mean activity for STS in 46,X,i(Xq) patients was found to be present 1.12 ± 0.18 pmol/mg prot/h; in 45,X patients 1.06 ± 0.19 pmol/mg prot/h and 0.94 ± 0.12 pmol/mg prot/h in females controls. No statistical differences were found at the groups ($p>0.05$). There was not significant differences between X-chromosomes aberrations patients and females controls probably because the STS expression in leukocytes is different to that observed in fibroblasts.

ANTECEDENTES

1. Esteroides sulfatados.

Los esteroides sulfatados son componentes que se distribuyen ubicuamente en tejidos y fluidos corporales de mamíferos, son relativamente solubles en agua, poseen capacidad de interacciones lipofílicas debido a la estructura del anillo de ciclopentanofenantreno y tienen en común una unión éster sulfato 3β -hidroxiesteroide (1).

Los 3β -hidroxiesteroides sulfatados se forman a partir de los esteroides libres, por la acción de la sulfotransferasa (EC 2.8.2.2) presente en glándulas adrenales, hígado, piel, testículo, ovario y placenta. Posteriormente, son hidrolizados *in situ* por la enzima sulfato 3β -hidroxiesteroide sulfatasa o sulfatasa de esteroides (STS, EC 3.1.6.2.), distribuida ubicuamente para dar lugar a hormonas activas libres en los tejidos blancos (2) (Fig 1).

Aparentemente los esteroides sulfatados circulantes son biológicamente inactivos. El sulfato de pregnenolona no es

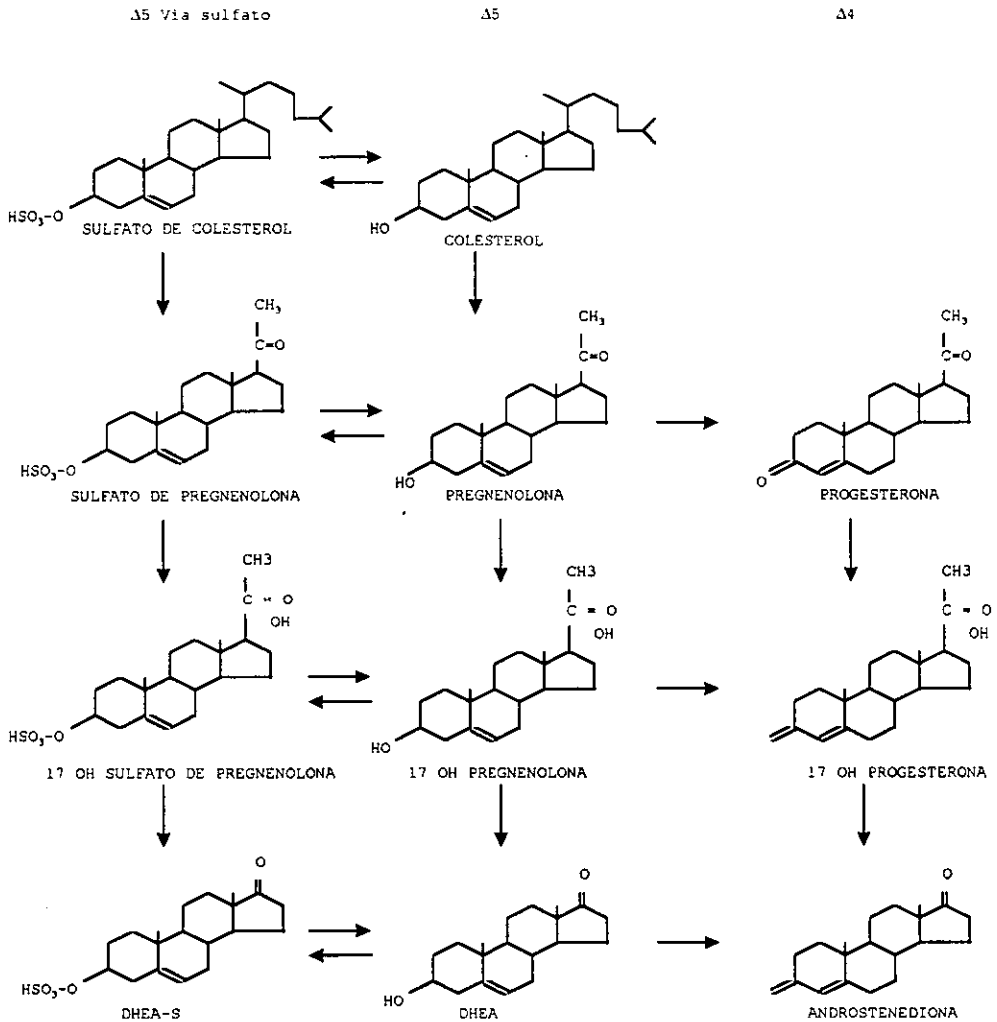


Figura 1. Interrelación de los esteroides sulfatados con otras vías metabólicas. Los esteroides sulfatados son convertidos a esteroides libres por la STS y estos pueden ser regenerados por acción de la sulfotransferasa. Los esteroides $\Delta 5$ pueden ser transformados a $\Delta 4$ por la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

activo *per se*, el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) no causa cambios en la actividad de enzimas reguladas por la dehidroepiandrosterona libre (DHEA) y los sulfatos de estrógenos aparentemente no interactúan con su receptor sin previa hidrólisis (3,4). Además, la vida media de los esteroides sulfatados es más larga que la del esteroide libre correspondiente. Esto ha sugerido que los esteroides sulfatados sean una fuente de precursores o reserva para la producción de hormonas activas.

El DHEA-S es el producto más abundante de la glándula suprarrenal humana, es precursor de estrógenos durante la gestación y participa en el metabolismo de andrógenos por el testículo (5-7). El DHEA-S secretado por la glándula suprarrenal materna durante la gestación temprana y posteriormente por las glándulas suprarrenales fetales, es el sustrato de grandes cantidades de estrógenos producidos durante la gestación humana normal. El DHEA-S que pasa al compartimiento fetal es sujeto de 16-hidroxilación en el hígado fetal y es convertido a estriol. Sin embargo, el principal sitio de conversión de DHEA-S a estrógenos es la placenta (5-7). Esta transformación metabólica requiere de la desulfatación del DHEA-S antes de la aromatización a estrógeno y la placenta contiene altos niveles de actividades de STS y aromatasa (8).

2. Arilsulfatasas

Las sulfatasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar las uniones éster-sulfato de varios esteroides sulfatados, a esta actividad se le conoce como "arilsulfatasa" (9). Las arilsulfatasas existen en seis formas: ARSA, ARSB, ARSC, ARSD, ARSE y ARSF. Estas se distinguen claramente ya que son codificadas por genes diferentes, se purifican independientemente, tienen pH óptimos distintos y poseen diferentes susceptibilidades a inhibidores (Tabla I). Aunque pueden hidrolizar el mismo sustrato artificial, sus sustratos naturales son diferentes: sulfato cerebrósidos para la ARSA, dermatán sulfato para la ARSB y sulfatos de 3β -hidroxiesteroide para la ARSC. Las arilsulfatasas ARSA y ARSB son enzimas lisosomales, su pH óptimo es ácido, son inhibidas por sulfato, fosfato y bario y su deficiencia causa leucodistrofia metacromática y mucopolisacaridosis tipo IV, respectivamente (10,11). La ARSC es más conocida como STS, debido a que hidroliza los esteroides sulfatados, tiene localización microsomal, su pH óptimo va de neutro a alcalino, se inhibe por CN^- y su deficiencia causa ictiosis ligada al cromosoma X (12). Por otra parte, los genes de las ARSD, ARSE y ARSF se localizan en Xp22.3 y presentan alta homología con el gen de la arilsulfatasa C (13). La ARSE es

termolábil, se inhibe por warfarina y su deficiencia causa condrodistrofia punctata recesiva ligada al cromosoma X (14). Los substratos naturales y varias de las características bioquímicas de las enzimas codificadas por los genes ARSD, ARSE y ARSF no se conocen y hasta este momento se ha sugerido que las deficiencias de arilsulfatasas D y F no producen un fenotipo reconocible (13) (Tabla I).

Tabla I. Características de las arilsulfatasas

Enzima	Substrato	ph óptimo	Inhibidor	Enfermedad	Ref
ARSA	Dermatán sulfato	Acido	Fosfato	Leucodistrofia metacromática	10
ARSB	Cerebrósidos sulfatados	Acido	Bario	Mucopolisacaridosis tipo IV	11
ARSC	Esteroides sulfatados	Neutro a alcalino	CN-	Ictiosis ligada al X	12
ARSD	*	*	*	*	13
ARSE	*	Alcalino	Warfarina	Condrodistrofia punctata	14
ARSF	*	*	*	*	13

*: no se conoce

3. Sulfatasa de esteroides

Se han reportado dos isoenzimas de arilsulfatasa C, designadas "f" (*fast*, migración rápida) y "s" (*slow*, migración lenta), debido a sus diferencias en la movilidad electroforética. La forma "s" corresponde a la STS, es inmunoprecipitada por anticuerpos monoclonales, en contraste con la forma "f" que no es reconocida por estos anticuerpos (15,16). Estas isoformas ligadas al cromosoma X son productos de genes diferentes y no son consecuencia de modificaciones postraduccionales del mismo producto génico. Existe poca similitud entre ambas secuencias y no son consecuencia de un procesamiento diferencial a partir de un transcrito primario común (16). La expresión de las dos variantes es tejido específica: la forma "s" es más abundante en placenta, tiroides, corazón, bazo, músculo esquelético y glándula suprarrenal, mientras que la forma "f" se detecta en hígado, riñón y páncreas. Aunque ambas comparten algunas características bioquímicas, difieren en sus estructuras proteicas, pH óptimo, labilidad al calor, propiedades antigénicas y especificidad a sustratos. La forma "s" tiene alta actividad específica hacia los sustratos naturales de la STS y la forma "f" tiene solamente 2 a 7% de la actividad de la STS (17-19).

Existen datos que confirman que la actividad de la STS se asocia con un solo gen en humanos: 1) las actividades detectadas para la enzima copurifican para homogeneidad y son inhibidas competitivamente por todos los esteroides sulfatados (20), 2) los anticuerpos contra STS inhiben todas las actividades de la enzima (17,21), 3) todas las actividades identificadas para la STS se localizan en la misma región del brazo corto del cromosoma X en los experimentos en células somáticas, 4) en pacientes con deleción del gen de la STS existe pérdida de varias actividades de la enzima (22) y 5) la transfección de plásmidos con cDNA de STS confiere todas las actividades de la enzima a las células receptoras (21)

La STS se localiza principalmente en el retículo endoplásmico rugoso, además del aparato de Golgi, retículo trans-Golgi, membrana plasmática y vía endocítica (23). Estudios desarrollados en placenta humana usando anticuerpos monoclonales anti STS e hibridación *in situ*, revelaron una distribución más específica de la proteína. Tanto la inmunorreactividad como la hibridación *in situ* demuestran que la STS es sintetizada por el sincitiotrofoblasto de la placenta y que ésta se limita al retículo endoplásmico rugoso (8).

La forma activa de la STS es un multímero de subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 63

kDa aproximadamente. El agregado más pequeño que puede tener actividad es un dímero de 126 kDa (21). La enzima es una glucoproteína que presenta cuatro sitios potenciales de N-glucosilación, aunque sólo dos son utilizados (24). La enzima es estable al calor, alteraciones al pH y a la exposición a urea (21,25,26). Los estudios de biosíntesis y procesamiento muestran que la STS sintetizada *de novo* es convertida en 2 días a una forma madura de 61 kDa por procesamiento de las cadenas de oligosacáridos (24, 25-28). La vida media de los polipéptidos de STS es de aproximadamente 4 días (27) y los estudios de secuenciación muestran una proteína madura de 583 aminoácidos (24). La STS tiene las propiedades de una proteína integral de la membrana y se ha propuesto un modelo de tres dominios para la topología de la enzima. Los dominios N- y C- terminal se localizan en el lado luminal de la membrana. Ambos contienen una cadena de oligosacáridos y están conectados por un dominio hidrofóbico que comprende dos secuencias que se expanden en la membrana en direcciones opuestas (24).

4. Inactivación del cromosoma X y la STS.

La inactivación de uno de los cromosomas X en mujeres normales (46,XX) resulta en la compensación de dosis de la expresión de productos génicos ligados al X comparada con

varones (46,XY) (29-31). Este proceso es ejemplo de un patrón programado en el desarrollo de regulación de la expresión génica durante la embriogénesis temprana y ocurre en todas las células somáticas de mamíferos hembras (32-34).

La inactivación del cromosoma X ocurre en el paso de mórula a blastocisto, iniciándose en el trofoectodermo, seguido por el endodermo primitivo, posteriormente por el ectodermo embrionario y finalmente por la masa celular interna (32). En tejidos no embrionarios el cromosoma X paterno se inactiva preferencialmente. En la masa celular interna la inactivación del cromosoma X es en forma aleatoria donde el X inactivo puede ser el materno o el paterno (32,35). Una vez establecida la inactivación de uno de los dos cromosomas X, ésta será conservada como una característica en sus descendientes clonales (32). Existen excepciones para la inactivación al azar del cromosoma X como ocurre en la pérdida de material de uno de los cromosomas X (delección, anillo o isocromosoma), en este caso el X estructuralmente anormal siempre se inactiva y forma el corpúsculo de Barr, el cual puede ser más grande o pequeño que lo normal. Si el X intacto fuera inactivado y el X anormal funcional, las células no serían viables (31,32). En el caso de las translocaciones entre el cromosoma X y un autosoma, la inactivación depende de si la translocación es balanceada o no balanceada. En las balanceadas el X normal

se inactiva para mantener los fragmentos del X translocado y evitar la inactivación del segmento del autosoma. En las translocaciones no balanceadas, se inactiva el X translocado con el segmento autosómico extra, evitando así las trisomías autosómicas parciales (31,32).

Si la inactivación fuera completa en la mujer, se esperaría que las pacientes 45,X y las portadoras de alteraciones estructurales, en las que el cromosoma X anormal se inactiva preferencialmente, fueran indistinguibles de la mujer normal XX, pero son estériles y fenotípicamente diferentes, lo que indica claramente que la compensación de dosis es incompleta (36,37). Existen varios genes codificados en el cromosoma X que escapan al proceso de inactivación (31). Esto permite explicar algunas de las anomalías observadas en los estados aneuploides del cromosoma X (36).

Actualmente se sabe que existen al menos trece genes que escapan al proceso de inactivación y varios tienen un homólogo en el cromosoma Y (31). Algunos se encuentran agrupados en la porción distal del brazo corto del cromosoma X, y otros en la región pseudoautosómica en Xp22.3, la cual es compartida por el cromosoma Y y entra en recombinación durante la meiosis masculina (38). Entre estos genes se encuentran el Xg que controla un antígeno eritrocitario (39), el del anticuerpo monoclonal 12E7 o MIC2 (40), el gen

del receptor para el factor estimulante de colonias de macrófagos CSF2RA (41,42), ANT3 un gen del grupo de las adenina nucleótido translocasas (43) y el gen XE7 (44).

Otros se localizan en Xp22.3, pero adyacentes a la región pseudoautosómica, el gen de STS (45-48), el gen KAL, responsable del síndrome de Kallman (49,50) y el gen GS2 o DXS1283E, que produce un transcrito en placenta y fibroblastos y posteriormente una proteína de función desconocida que se encuentra entre STS y KAL (51). El gen ZFX (por "*zinc finger protein*") se encuentra en Xp21.3-p22.1, próximo a los anteriores pero fuera de la región pseudoautosómica (52).

El gen A1S9T o UBE1, que complementa un defecto sensible a la temperatura en la síntesis de DNA en el ratón (53) y el gen XE169 (SMCX o DXS1272E), se localizan en Xp11.1 a Xp11.3 (54). El gen DXS423E se localiza en Xp11.21 (54).

A diferencia de los otros genes, que han sido localizados en los brazos cortos del cromosoma X, el gen RPS4X, que codifica para una isoforma de la proteína ribosomal S4, y el XIST que codifica para un transcrito específico del cromosoma X inactivo, se encuentran en Xq13.1 (55,56); donde además se localiza el centro de inactivación del cromosoma X o XIC (57).

El gen de la STS se localiza en Xp22.3 (45-48), se compone de 10 exones y tiene aproximadamente 140 Kb de DNA (21,58,59). Se ha encontrado un homólogo no funcional en el cromosoma Y que ha sido clonado y localizado en Yq11.2 (21,60) (Fig 2). Este locus es un pseudogen ya que presenta varios cambios de nucleótidos sencillos y pequeñas deleciones que interrumpen los marcos de lectura. Sin embargo, las posiciones de los límites intrón-exón son similares a los del gen en el cromosoma X y existe un 90 % de similitud entre las copias de X y Y (61).

El gen STS escapa al proceso de inactivación del cromosoma X, por lo que se expresa tanto en el cromosoma activo como en el inactivo (62-65). Estudios en fibroblastos que son dobles heterocigotos para STS y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), demostraron que el gen STS se expresa en todas las clonas con cromosoma X activo o inactivo, en cambio la G6PD no escapa al proceso de inactivación y se expresa sólo en la clona donde el X está activo (64). Posteriormente, analizando líneas celulares híbridas humano-murinas, la expresión persistente de la STS humana en la línea celular con el X inactivo reforzó la evidencia de que el gen STS escapa a la inactivación (66).

La razón de que algunos genes en el cromosoma X escapen a la inactivación podría ser a través de factores intrínsecos de su estructura, que les proveen resistencia a

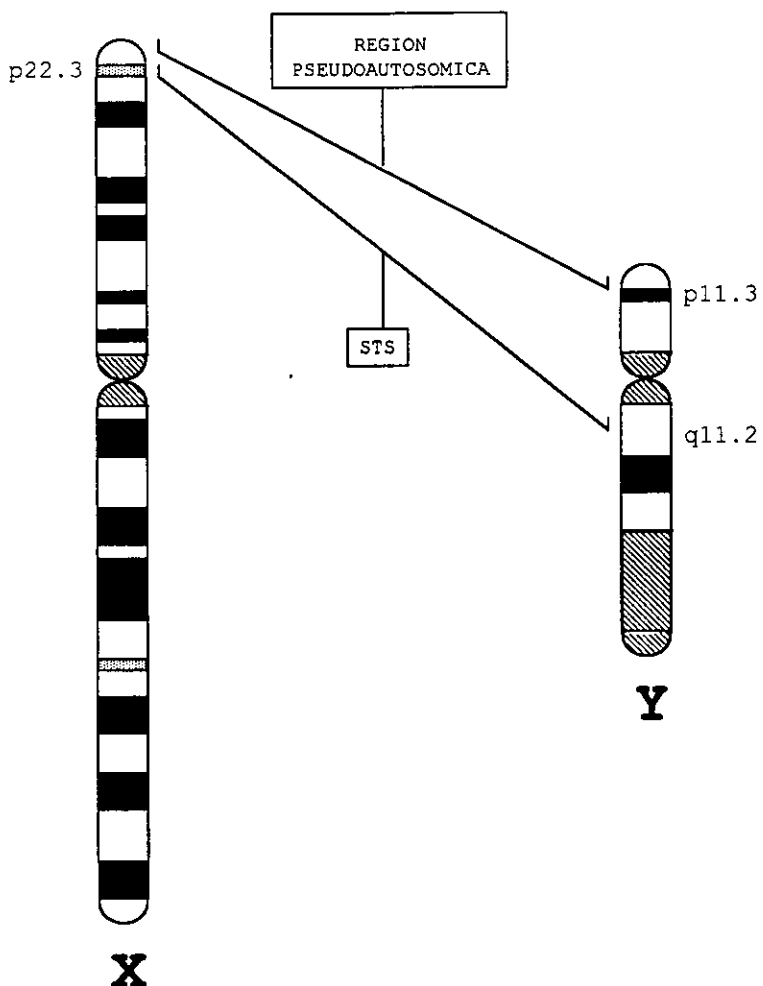


Figura 2. Localización del gen de la STS. El gen mapea proximal a la región pseudoautosómica en el brazo corto del cromosoma X y tiene una copia no funcional en el brazo largo del cromosoma Y.

la inactivación. Esta conclusión deriva de estudios en pacientes con translocaciones e inversiones del cromosoma X. Los segmentos autosómicos translocados en el extremo distal de Xp pueden inactivarse si el cromosoma X se encuentra inactivo. De esta manera, los genes translocados a una posición similar a la de STS pueden inactivarse (67). Por otra parte, en una paciente con una inversión del cromosoma X y en su hijo con un cromosoma X recombinante derivado del primero, los loci STS y MIC2X se localizaron en los brazos largos del X y aún flanqueados por secuencias de DNA inactivas, éstos continuaron expresándose (68). Por lo tanto, parecería que STS y MIC2X escapan a la inactivación por un mecanismo independiente de su posición en el cromosoma X. Los autores proponen que la inactivación actúa de manera específica de secuencia y que los genes que escapan al proceso carecen de estas secuencias, por lo tanto no son inactivados (68).

5. Actividad enzimática de la STS.

A pesar de que el gen de la STS se expresa en ambos cromosomas X en la mujer, la medición de la actividad enzimática de la STS en varones y mujeres no refleja las diferencias en el número de cromosomas X entre ambos sexos (62,65,69). Se ha reportado una diferencia clara en la

actividad de la STS entre hombres y mujeres normales en varios tejidos. Aunque las células con dos cromosomas X tienen más actividad que las células con un X, la relación no es la esperada de 2:1 para un gen que escapa al proceso de inactivación. La proporción de la actividad entre ambos sexos varía en las diferentes células analizadas siendo de 1.8 en placenta, 1.7 en fibroblastos, 1.3 en leucocitos y de 1.04 en folículo piloso (32,62,70). Este efecto de dosis incompleta sugiere que el locus de STS en el cromosoma X inactivo podría no expresarse completamente. La medición de la actividad enzimática en fibroblastos de heterocigotas para STS, demuestra que existe una represión para la expresión del gen en el X inactivo en comparación con el X activo, lo que indica que el gen escapa parcialmente al proceso de inactivación (62,65,69,71-76).

Los datos de la actividad de la STS en estudios de sujetos aneuploides no han dado resultados consistentes. Ropers y cols analizaron la actividad enzimática en fibroblastos de pacientes con alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma X y ésta aparentemente se correlaciona con el número de copias funcionales del gen. En las monosomías o deleciones de brazos cortos del X, que llevan una sola copia del gen, la actividad de la STS es comparable a la de varones normales y menor que la de mujeres normales. En translocaciones o deleciones de brazos

largos, con dos copias del gen, la actividad se encuentra en rangos femeninos normales o en algunos casos los exceden, y los casos de cromosomas supernumerarios, con más de dos copias del gen, los valores superan los rangos femeninos normales (70).

Así mismo, Chance y Gartler examinaron en fibroblastos la actividad de la STS, variando el número de cromosomas X de uno a cuatro y en tres líneas celulares con alteraciones estructurales del cromosoma X. Al parecer no hay diferencias en la actividad de la STS entre 45,X y 46,XY, tampoco existen diferencias entre las líneas celulares con 2X cuando se comparan con las de 3X y 4X. Por otra parte, cuando las células con un sólo X son comparadas con células con múltiples X, la actividad enzimática es significativamente elevada. En las alteraciones estructurales, la actividad de la STS indicó que con una copia del gen (delección de brazo corto), el rango es el mismo que para 45,X y 46,XY. En las alteraciones con dos copias del gen de la STS, tal como en una translocación X:21, la actividad se presentó en los rangos femeninos normales; sin embargo, en una delección del brazo largo del X la actividad es similar a la de las células con un X, sugiriendo en ese caso inactivación del locus de STS (75).

6. Síndrome de Turner.

El síndrome de Turner describe a las pacientes con alteraciones numéricas y/o estructurales del cromosoma X, asociadas con cuatro características cardinales: 1) fenotipo femenino, 2) talla baja, 3) infantilismo sexual debido a gónadas rudimentarias y 4) una variedad de anomalías fenotípicas que incluyen, microrretrognatia, cuello corto y alado, tórax ancho, *cubitus valgus* y clinodactilia del quinto dedo de las manos entre otras (77-81). Cualquiera de estas características puede ser modificada por la presencia de grados variables de deficiencia de cromosoma sexual (79-83).

La incidencia del síndrome de Turner se reporta de 1:2000 a 1:2500 recién nacidas vivas (77,81-85). Las frecuencias de las diferentes alteraciones del cromosoma X sugieren que 50 a 60% presentan monosomía del cromosoma X (45,X), 30 a 40% son mosaicos y de éstos 10 a 15% son 45,X/46,XX y 2 a 5% 45,X/46,XY. De todas las alteraciones del cromosoma X las anomalías estructurales constituyen el 28%, siendo la más frecuente el isocromosoma de brazos largos del cromosoma X [i(Xq)] representando 12 a 20%, ya sea en forma simple o como mosaico (77-79,81,82). La incidencia reportada para el resto de las alteraciones no es bien conocida, pero se considera que el anillo del cromosoma

X [r(X)], la deleción de brazos cortos [del(Xp)] y la deleción de brazos largos [del(Xq)] son las que siguen en frecuencia.

Debido a que en alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma X la actividad de la STS se ha estudiado sólo en fibroblastos, en este trabajo se comparó la actividad de la STS en leucocitos de pacientes con isocromosoma de brazos largos del cromosoma X [46,X,i(Xq)] y monosomía del cromosoma X (45,X) con controles femeninos sanos, para conocer si existe variación en la actividad enzimática en estas alteraciones dependiendo de la línea celular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La STS se distribuye ubicuamente en tejidos de mamíferos e hidroliza las uniones de éster-sulfato de los esteroides sulfatados. El gen se localiza en Xp22.3 y escapa al proceso de inactivación. Sin embargo, la medición de la actividad de la STS en varios tejidos no refleja completamente las diferencias en el número de cromosomas X entre mujeres y varones, ya que la proporción de la actividad enzimática no es la esperada de 2:1 y diversos estudios han reportado una diferencia clara en la actividad de la STS en varios tejidos. La relación de la actividad enzimática mujer/hombre varía en las células analizadas, siendo de 1.8 en placenta, 1.7 en fibroblastos, 1.3 en leucocitos y 1.04 en folículo piloso. Este efecto sugiere que el gen escapa parcialmente al proceso de inactivación. Aunque los datos de estudios en sujetos aneuploides no son consistentes, la actividad de la STS medida en fibroblastos se correlaciona parcialmente con el número de copias funcionales del gen. Se ha reportado en pacientes con 45,X y alteraciones estructurales con una sola copia del gen de STS, una actividad por debajo de los rangos femeninos y similar a la de varones. En las alteraciones con dos copias del gen, la actividad se encuentra en rangos femeninos normales, y con más de dos copias del gen, los

valores exceden los límites femeninos normales, pero sin demostrar diferencias significativas.

En sujetos normales los datos de la actividad de la STS varían de acuerdo a la línea celular estudiada siendo en leucocitos menor que en fibroblastos (1.3 vs 1.7). En las alteraciones numéricas del cromosoma X la actividad de la STS se ha estudiado en fibroblastos y esta no siempre se correlaciona con el número de copias del gen, como en el caso de los cromosomas X supernumerarios. En este estudio se analiza la actividad enzimática de la STS en leucocitos de pacientes con isocromosoma de brazos largos del cromosoma X [i(Xq)] (las cuales sólo poseen una copia del gen de STS) y se compara con pacientes con monosomía del cromosoma X (45,X) y mujeres normales, para conocer si existen diferencias en la actividad enzimática de la STS a la reportada en fibroblastos.

PROBLEMA GENERAL

¿ Cual es la actividad de la STS en leucocitos, en pacientes con 46,X,i(Xq), comparada con la de pacientes con 45,X y mujeres normales 46,XX ?

PROBLEMAS ESPECIFICOS

1) ¿ Es la actividad de la STS en leucocitos, en pacientes con 46,X,i(Xq) similar a la de pacientes con 45,X ?

2) ¿ Es la actividad de la STS en leucocitos, en pacientes con 46,X,i(Xq) menor a la de mujeres normales 46,XX ?

HIPOTESIS GENERAL

La actividad de la STS en leucocitos, en pacientes con 46,X,i(Xq), es similar a la de pacientes con 45,X y menor a la de mujeres normales 46,XX.

HIPOTESIS ESPECIFICAS

1) La actividad de la STS en leucocitos en pacientes con 46,X,i(Xq) es similar a la de pacientes con 45,X

2) La actividad de la STS en leucocitos en pacientes con 46,X,i(Xq) es menor a la de mujeres normales 46,XX

OBJETIVO GENERAL

Identificar si la actividad de la STS en leucocitos, en pacientes con 46,X,i(Xq), es similar a la de pacientes con 45,X y menor que la de mujeres normales 46,XX

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1) Identificar si la actividad de la STS en leucocitos en pacientes con 46,X,i(Xq) es similar a la de pacientes con 45,X

2) Identificar si la actividad de la STS en leucocitos en pacientes con 46,X,i(Xq) es menor a la de mujeres normales 46,XX

MATERIAL Y METODOS

1.- *Sujetos del estudio:* Se estudiaron pacientes que acudieron al servicio de Genética del Hospital General de México S.Sa. con diagnóstico inicial de síndrome de Turner, y pacientes con diagnóstico citogenético previo de 45,X y 46,X,i(Xq).

2.- *Diseño del estudio:* Prospectivo, Transversal, Observacional y Comparativo.

3.- *Criterios de selección de la muestra:*

Para las pacientes de interés

Criterios de inclusión

- a) Pacientes mayores de 16 años
- b) Con diagnóstico citogenético en leucocitos de 45,X
- c) Con diagnóstico citogenético de 46,X,i(Xq)
- d) Sin terapia hormonal sustitutiva

Criterios de no inclusión

- a) Con alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma X diferentes a las mencionadas
- b) Con terapia hormonal sustitutiva
- c) Mosaicos del cromosoma X

Criterios de eliminación

- a) Que no aceptaron la toma de muestra sanguínea
- b) En quienes no se logró completar el estudio
- c) Que no se confirmó el diagnóstico citogenético

Para las mujeres sanas

Criterios de inclusión

- a) Pacientes mayores de 16 años
- b) Que no tomaran hormonales orales
- c) Citogenéticamente 46,XX

Criterios de no inclusión

- a) Con enfermedades ligadas al cromosoma X
- b) Con alteraciones numéricas y/o estructurales del cromosoma X
- c) Que tomaran hormonales orales

Criterios de eliminación

- a) Que no aceptaron la toma de muestra sanguínea
- b) En quienes no se logró completar el estudio

4.- *Definición de las variables*

Para el problema específico 1:

Variable dependiente: Actividad de la STS

Variable independiente: Pacientes con 46,X,i(Xq)
Pacientes con 45,X

Para el problema específico 2:

Variable dependiente: Actividad de la STS

Variable independiente: Pacientes con 46,X,i(Xq)
Mujeres 46,XX

5.- Definición operativa de las variables

a) *Actividad de la STS*: Separación hidrolítica del grupo sulfato en 3β -hidroxiesteroides sulfatados. Es medida por la conversión de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) a DHEA, usando como sustrato 7- ^3H -DHEA-S para 7- ^3H -DHEA, medida en pmol/mg/proteína/h (63,64,70,72).

Escala cuantitativa continua

b) *Isocromosoma de brazos largos del cromosoma X*: Cromosoma anormal con los dos brazos largos de la misma longitud y con el mismo patrón de bandas dispuestas en una secuencia invertida; se designa como 46,X,i(Xq), se concluirá que se trata de un isocromosoma cuando se detecte citogenéticamente por técnicas habitual y de bandas G y C contando 100 metafases (82).

Escala nominal.

c) *Monosomía del cromosoma X*: Estado en el que se encuentra un cromosoma X menos que el número diploide normal, designándose como 45,X. Se concluirá que se trata de una monosomía cuando sólo se encuentre un cromosoma X del par por técnica habitual contando 100 metafases (82).

Escala nominal

d) *Mujer 46,XX*: Citogenéticamente 46,XX, sin alteraciones numéricas ni estructurales del cromosoma X y que no presente enfermedades ligadas al cromosoma X clínicamente.

Escala nominal

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para el cálculo del tamaño de muestra se empleó la fórmula para comparación de medias (86,87), tomando en cuenta los siguientes parámetros:

$$\alpha = 0.05$$

$$\beta = 0.1$$

Diferencia esperada entre las medias del 30%

$$n = 5 \text{ sujetos por grupo}$$

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Debido al tamaño de muestra requerido se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas (87). Tomando en cuenta que la actividad de la STS es medida en una escala cuantitativa continua y los grupos 45,X, 46,X,i(Xq) y 46,XX se miden en una escala nominal, la prueba estadística empleada fue la U de Mann-Withney para ambas hipótesis específicas, considerando un nivel α de significancia de 0.05. Los datos se analizaron con el paquete estadístico STATA (88).

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para el cálculo del tamaño de muestra se empleó la fórmula para comparación de medias (86,87), tomando en cuenta los siguientes parámetros:

$$\alpha = 0.05$$

$$\beta = 0.1$$

Diferencia esperada entre las medias del 30%

$$n = 5 \text{ sujetos por grupo}$$

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Debido al tamaño de muestra requerido se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas (87). Tomando en cuenta que la actividad de la STS es medida en una escala cuantitativa continua y los grupos 45,X, 46,X,i(Xq) y 46,XX se miden en una escala nominal, la prueba estadística empleada fue la U de Mann-Whitney para ambas hipótesis específicas, considerando un nivel α de significancia de 0.05. Los datos se analizaron con el paquete estadístico STATA (88).

PROCEDIMIENTOS

Las pacientes del estudio se captaron en la clínica de diferenciación sexual del servicio de Genética del Hospital General de México S. Sa. que acudieron por primera vez con fenotipo de síndrome de Turner, y por la búsqueda de aquellas pacientes que habían sido diagnosticadas previamente como 45,X y 46,X,i(Xq). A todas las integrantes del estudio (pacientes y mujeres normales), se les invitó a participar mediante explicación verbal y después de firmar la carta de consentimiento (Anexos I y II). En todas las pacientes se realizó valoración clínica de acuerdo a la hoja de recolección de datos (Anexo III) y posteriormente se citaron para el procesamiento del cariotipo por técnica habitual y de bandas G y C, de acuerdo a la siguiente metodología.

Cariotipo en linfocitos de sangre periférica: Se tomó una muestra de 5 ml de sangre de las venas del pliegue del brazo en una jeringa heparinizada (10 UI de heparina por ml de sangre). Se adicionó 1 ml de la muestra en 5 ml de medio de cultivo (McCoy 5a) suplementado con 0.5 ml de suero de ternera fetal, antibióticos (Penicilina 2,000 U/ml y estreptomycinina 275 mg/ml) y 0.5 ml de fitohemaglutinina. Se

incubó a 37°C durante 70.5 h, posteriormente se adicionó 0.5 ml de solución de colchicina al 0.02% en agua destilada estéril y se incubó nuevamente a 37°C por 1.5 hrs. Los cultivos se transfirieron a tubos cónicos de centrifuga de 15 ml para centrifugar a 3000 rpm durante 5 min, decantando posteriormente el sobrenadante y resuspendiendo el botón, agregando solución hipotónica (KCl 0.075M) a 37°C agitando en el vortex, dejando reposar durante 30 min a 37°C. Se centrifugó a 3000 rpm, durante 5 min decantando el sobrenadante y resuspendiendo el botón agitando en el vortex y agregando gota a gota 5 ml de fijador (metanol-ácido acético 3:1). Se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente. Nuevamente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min decantando el sobrenadante y resuspendiendo el botón en 5 ml de fijador, repitiendo la operación las veces necesarias hasta obtener un botón blanco y un sobrenadante claro (5 veces aproximadamente). Para hacer las preparaciones se resuspendió el botón y con una pipeta pasteur se dejaron caer 2 a 3 gotas a una altura de 15 cm aproximadamente sobre un portaobjetos limpio, dejando secar al aire. Las laminillas se tiñeron con Giemsa durante 5 min (3 ml de Giemsa y 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8) (89).

Bandas G: Después de secar al aire las laminillas, se dejaron envejecer por una semana, colocándose posteriormente durante 10 segundos o más en una solución de 3 ml de

tripsina al 1% con 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8 a 37°C. Las laminillas se lavaron con agua corriente y se tiñeron durante 1 min con Giemsa (89).

Bandas C: Las laminillas se colocaron en HCl 0.2 N por 15 a 30 min, lavándose después con agua destilada y colocándose posteriormente en Ba(OH)₂ (0.065 M) a 37°C por 15 a 30 min y lavándose con agua destilada a 37°C. Se colocaron las laminillas en 2xSSC (8.82 g de citrato de sodio y 17.53 g de NaCl en 1000 ml de agua destilada) a 60°C durante 2 h. Las laminillas se lavaron con agua destilada a 60°C y después con agua corriente y se tiñeron durante 1 min con Giemsa (89).

Una vez realizado, o confirmado el diagnóstico citogenético de las pacientes 45,X o 46,X,i(Xq) y si cumplían con los criterios de selección, se procedió a citar a quienes cumplieran con los criterios para formar el tercer grupo de mujeres normales, tomándose la muestra para el procesamiento del cariotipo. En cuanto se tuvieron los resultados del análisis citogenético se citó a una paciente de cada grupo el mismo día y a la misma hora para obtener la segunda muestra de sangre para separar los leucocitos en el servicio de Genética, quien procesó la muestra no conocía el diagnóstico citogenético de las pacientes de acuerdo a la siguiente metodología.

Aislamiento de leucocitos: Se tomó una muestra de 10 ml de sangre de las venas del pliegue del brazo en una jeringa heparinizada (10 UI de heparina por ml de sangre). Todas las muestras fueron tomadas a la misma hora del día y después de un ayuno de por lo menos 8 horas. Cada muestra sanguínea se diluyó con un volumen igual de solución de NaCl al 0.9% y posteriormente se adicionó un volumen de 0.2 ml de Ficoll-Hypaque (1.077 g/mL de densidad) en una relación de 5:2. La aplicación del Ficoll-Hypaque debe quedar en la parte inferior de la muestra respetándose la interfase, esta última debe conservarse para asegurar la separación de mononucleares del resto de la sangre. Para esto, se aplica el Ficoll-Hypaque con una pipeta pasteur, descansando sobre el fondo de la muestra, para que el Ficoll-Hypaque desplace hacia arriba la muestra de sangre. Para obtener los leucocitos, las muestras se centrifugaron durante 25 minutos a 350 x g. Los mononucleares forman un anillo separando el suero del Ficoll-Hypaque, 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 de NaCl al 0.9%. Los eritrocitos residuales se eliminaron con solución de NH_4Cl al 0.85% durante 10 min y posteriormente a los leucocitos se les dió tres lavados con solución de NaCl al 0.9% (90,91).

Una vez separados los leucocitos el mismo día se determinó la actividad de la STS, la muestra se procesó en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M., sin que se conociera el diagnóstico citogenético de las pacientes. El procedimiento se realizó de acuerdo a la siguiente metodología

Determinación de la actividad de la STS: Se empleó la población de mononucleares obtenida de la manera descrita anteriormente. De acuerdo a las condiciones óptimas descritas previamente para realizar el ensayo enzimático. las muestras se resuspendieron en 1 ml de amortiguador-tris 0.014 M frío, a un pH de 7. Las células fueron rotas con un Polytron PT10 en dos ciclos a velocidad máxima, uno de 10 y otro de 20 segundos. Para determinar la actividad de la STS en el homogeneizado, se usó sulfato de 7-[³H]-Dehidroepiandrosterona (7-[³H]-DHEA-S) como sustrato, para obtener como producto a la Dehidroepiandrosterona (7-[³H]-DHEA). Se incubaron 5 pmol de 7-[³H]-DHEA-S con 150 µl del homogeneizado por 2 horas a 37°C. La incubación fue detenida adicionando 1 ml de benceno frío. Las muestras se agitaron en vortex durante 2 minutos y se centrifugaron 5 minutos a 2500 rpm para obtener una separación adecuada de las fases orgánica y acuosa. Se formaron alícuotas de 600 µl de la fase orgánica (sobrenadante de benceno) en viales de vidrio a los cuales se les aplicó 5 ml de líquido de centelleo para

la determinación de radiactividad en 7-[³H]-DHEA, empleando un espectrómetro de centelleo de líquidos. Los ensayos se realizaron por duplicado y la extracción de 7-[³H]-DHEA se confirmó por cromatografía de la fase orgánica (25,26,89).

Una vez completada la muestra y después de obtener los resultados del análisis citogenético y del ensayo de la actividad de la STS, se procedió al análisis de los datos para obtener los resultados finales.

RESULTADOS

El análisis citogenético se realizó por técnica habitual, bandas G y bandas C, formando tres grupos de 6 sujetos cada uno de acuerdo al resultado del análisis citogenético. Todas las pacientes fueron mayores de 16 años, el promedio de edad fue de 23.8 ± 3.6 años en el grupo 46,XX, de 24.2 ± 3.1 en el grupo 45,X y de 23.8 ± 4.4 en 46,X,i(Xq).

En los controles femeninos sanos 46,XX se descartaron alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas, en el grupo de pacientes 45,X no se reconocieron citogenéticamente mosaicos ni alteraciones estructurales. El análisis citogenético del grupo de pacientes 46,X,i(Xq) efectuado por bandas G mostró que todas presentaban 46,X,i(Xq) (Figura 3). Las bandas C mostraron que 5 pacientes portaban un isocromosoma monocéntrico y una paciente presentó un isocromosoma dicéntrico [46,X,idic(Xq)] (Figura 4).

Los resultados del ensayo de la actividad de la STS se muestran en la tabla III y en la figura 5. La actividad media de la STS en las pacientes 46,X,i(Xq) fue de 1.12 ± 0.17 pmol/mg/proteína/h, en el grupo de pacientes 45,X la actividad fue de 1.06 ± 0.19 pmol/mg/proteína/h y en el

grupo de controles 46,XX la actividad media fue de 0.94 ± 0.12 pmol/mg/proteína/h.

Inicialmente, para conocer si existían diferencias entre los tres grupos se realizó la prueba de Kruskal-Wallis en la cual se obtuvo una $p > 0.05$, concluyendo que no hay diferencias. Posteriormente, los resultados se analizaron con la prueba de U de Mann-Whitney comparando al grupo 46,X,i(Xq) con el grupo 45,X ($p >$ de 0.05) y con los controles 46,XX ($p >$ de 0.05), por lo que se concluyó que no existen diferencias significativas.

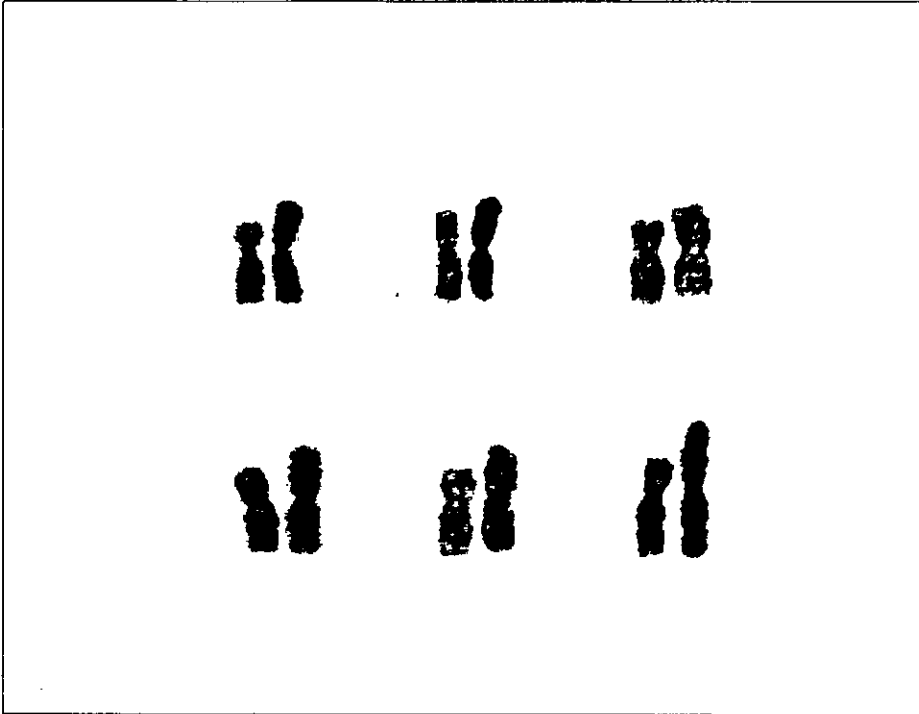


Figura 3. Cariotipos parciales de las pacientes 46,X,i(Xq).
A la izquierda se muestra el cromosoma X normal y a la
derecha el isocromosoma de brazos largos del X.

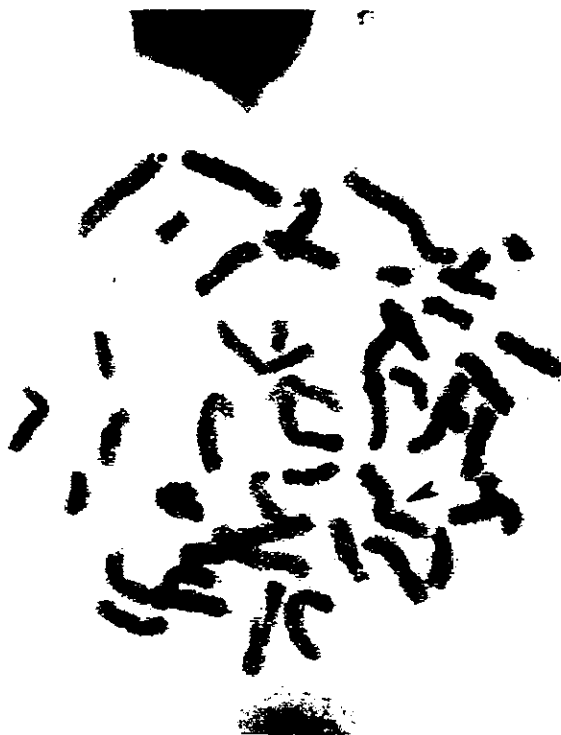


Figura 4. Bandas C de la paciente con 46, X, idic(Xq). La flecha indica al cromosoma X isodicéntrico.

TABLA II. Actividad de la sulfatasa de esteroides en leucocitos de pacientes 46,X,i(Xq), 45,X y controles femeninos 46,XX

46,X,i(Xq) n=6	45,X n=6	46,XX n=6
1.17	1.42	0.81
0.78	0.91	0.85
1.09	0.93	1.04
1.27	1.10	1.12
1.21	1.11	0.99
1.20	0.92	0.86
$\bar{X} = 1.12$ DS = 0.18	$\bar{X} = 1.06$ DS = 0.19	$\bar{X} = 0.94$ DS = 0.12

Los ensayos se realizaron por duplicado

Los valores son expresados en pmol/mg prot/hr

\bar{X} = Media, DS = Desviación estándar

46,X,i(Xq) vs 45,X $p > 0.05$

46,X,i(Xq) vs 46,XX $p > 0.05$

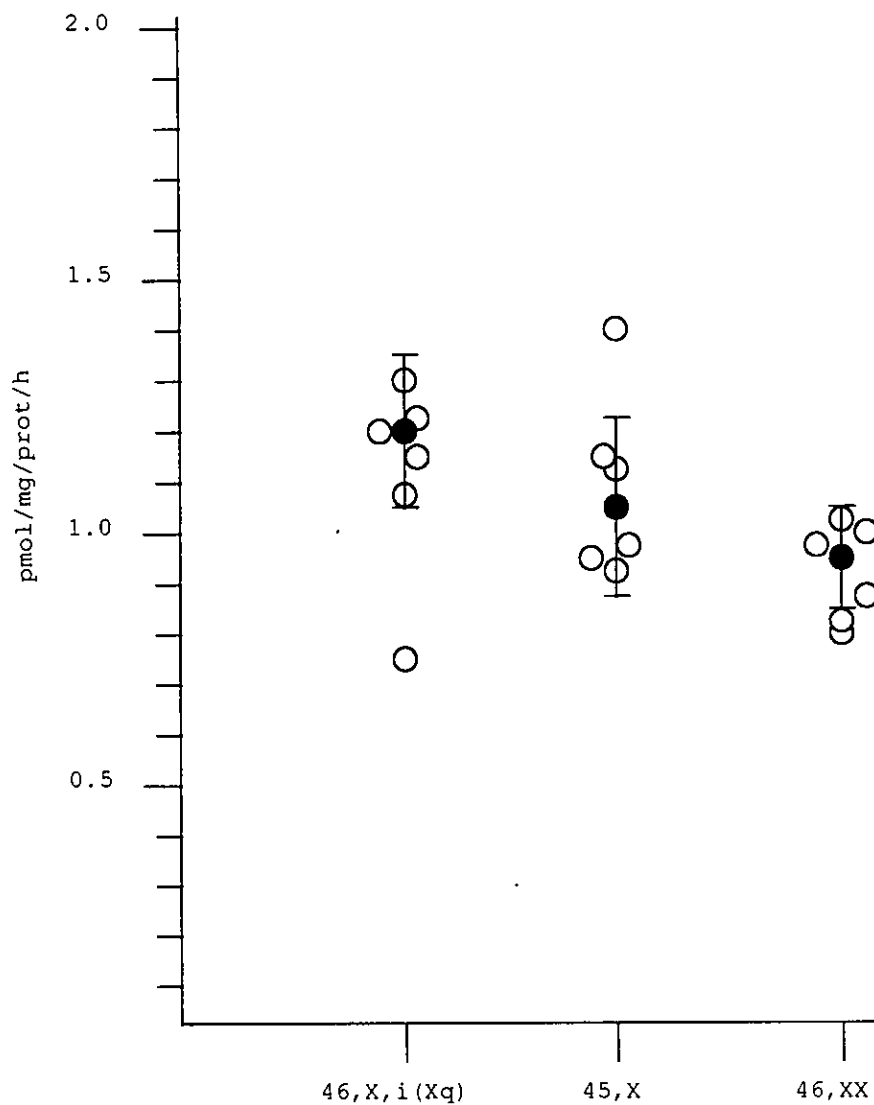


Figura 5. Actividad de la sulfatasa de esteroides en leucocitos de pacientes con 46,X,i(Xq), 45,X y 46,XX. Los círculos negros indican la actividad media de cada grupo con su desviación estandar, los círculos blancos la actividad individual.

DISCUSIÓN

La STS es una enzima microsomal que cataliza la hidrólisis del grupo sulfato de los 3 β -hidroxiesteroides (9). Existen dos isoenzimas de la STS, s y f, identificadas por su movilidad electroforética (15,16). El gen de la STS se localiza en Xp22.3 y escapa al proceso de inactivación del cromosoma X (45-48,62-65). La actividad de la STS se ha estudiado en varios tejidos, y aunque el gen se expresa en ambos cromosomas X en la mujer, la relación de la actividad enzimática entre mujeres y hombres no es la esperada de 2:1 reportándose una proporción de 1.3-1.7:1 (23,62,70).

En los dos únicos trabajos sobre la actividad de la STS en cultivos de fibroblastos, de sujetos con alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma X, la actividad aparentemente se correlaciona con el número de copias funcionales del gen (70,75). Ropers et al reportaron que pacientes con una copia del gen de STS, tienen una actividad por debajo de los rangos femeninos y similar a la de los varones. Con dos copias del gen la actividad se encuentra en rangos femeninos pero en algunos casos la superan, y con más de dos copias del gen los valores exceden los límites

femeninos normales (70). Chance y Gartler obtienen resultados similares con una y dos copias del gen STS, sin embargo, en el caso de los cultivos con cromosomas X supernumerarios no existen diferencias significativas entre la actividad media de los cultivos de estas alteraciones y la de los cultivos 46,XX (75).

En este estudio se analizó la actividad enzimática de la STS en leucocitos de pacientes 46,X,i(Xq), 45,X y se comparó con la de mujeres 46,XX. Nuestros resultados muestran una actividad similar de la STS en las pacientes 46,X,i(Xq) y 45,X cuando son comparadas con la de mujeres 46,XX (Tabla II y Figura 5). Por otra parte, estos datos expresan una diferencia en la actividad enzimática de la STS en leucocitos, comparada con los estudios realizados en fibroblastos. De acuerdo a los datos reportados en fibroblastos de pacientes con alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma X, se esperaría que en leucocitos de pacientes 45,X y 46,X,i(Xq), quienes sólo poseen un gen de STS, tuvieran actividad enzimática en niveles medios comparada con mujeres normales. Sin embargo, nuestros resultados muestran que no existen diferencias de la actividad de la STS en leucocitos de pacientes con estas alteraciones y las mujeres normales.

Analizando los estudios realizados en fibroblastos no parece existir realmente una correlación entre los niveles

de STS y el número de cromosomas X supernumerarios presentes. Si se observan los resultados de Ropers sólo un cultivo de 49,XXXYY presenta un valor de 3.5 veces sobre los cultivos 46,XX. Si éste es excluido, la media de los dos cultivos restantes no difiere significativamente de la de los 46,XX (70). Chance y Gartler proponen que quizá exista una limitación para el nivel intracelular de STS, tal vez controlada por loci autosómicos o alguna limitación inherente a los cultivos en rápida división (75). Sin embargo, el número de casos analizados es pequeño y quizá debido a esto no se detecten diferencias significativas. Esta interrogante se resolvería estudiando series más grandes de casos con más de dos cromosomas X.

Si en cromosomas supernumerarios existe una limitación para el nivel intracelular de STS, es probable que esta regulación actúe diferente en cada tipo de tejido, dependiendo si la enzima es importante o no en el metabolismo celular del tejido analizado. Tal vez en el leucocito el metabolismo de esta enzima es diferente al del fibroblasto, y debido a esto los niveles enzimáticos no muestran variación entre las pacientes 46,XX, 46,X,i(Xq) y 45,X.

De esta manera la STS provee un excelente marcador para estudiar la inactivación del gen STS debido a que a diferencia de otros genes que hasta el momento se conoce

escapan a la inactivación del cromosoma X, éste codifica para una enzima que puede ser analizada cuantitativamente (26,62,63). Sin embargo, no existe una explicación clara de la variación de la actividad enzimática encontrada en las diferentes líneas celulares en sujetos normales. En placenta la relación de la actividad es de 1.8:1 en las placentas obtenidas después del nacimiento de productos femeninos en comparación con los productos masculinos, mientras que en otros tejidos la relación de la actividad entre los sexos es menor, 1.7, 1.3 y hasta .1.04 en fibroblasto, leucocito y folículo piloso, respectivamente (32,62,91).

El hecho que la relación de la actividad entre mujeres y hombres normales no sea la esperada de 2:1, puede explicarse por la existencia de distintos factores. La inactivación parcial del gen es la explicación más satisfactoria a esta observación (65). Al parecer, los genes escapan a la inactivación por un mecanismo independiente de su posición en el cromosoma X y esto es apoyado por los datos encontrados en pacientes con translocaciones e inversiones del cromosoma X, en los cuales los genes de STS y MIC2X están colocados en el brazo largo del cromosoma, entre secuencias inactivas, y éstos continúan expresándose (68). Esto se refuerza por el hallazgo del gen XIST que se localiza en Xq13.1 y presenta un patrón de expresión único ya que está inactivo en el cromosoma X activo y activo en el

cromosoma inactivo (56). Además, el gen RPS4X, también en Xq13.1, que de igual forma escapa al proceso de inactivación (55). Se ha propuesto que el gen STS en el cromosoma X inactivo presenta una represión en su expresión por encontrarse entre genes inactivos y que su actividad se expresa sólo en niveles medios (65,68).

En el ratón, el gen de la STS también está ligado al cromosoma X, es pseudoautosómico y presenta un homólogo en el cromosoma Y, pero a diferencia del humano éste es funcional (92-94). Algunos estudios sugieren que STS en el ratón no está sujeto a la inactivación del cromosoma X en la hembra (92) y la actividad enzimática en esta especie indica una relación de 2:1 en oocitos XX comparada con XO (95). En el humano, la actividad de la STS en leucocitos ha sido menor que en otras líneas celulares (26,69). Los estudios de dosis muestran que la relación entre XX/XY es de 1.3 (69). De este modo, en el humano podrían existir otros mecanismos que expliquen esta heterogeneidad.

Aún más, en este estudio la actividad de la STS fue similar entre las pacientes 46,X,i(Xq), 45,X y 46,XX. Estos datos indican la existencia de mecanismos complejos que resultan en una gran variación de la actividad entre los sexos, tejidos y líneas celulares. Aunque existe controversia al respecto, el factor hormonal podría ser uno de estos mecanismos.

Müller y cols reportan una actividad enzimática en cultivo de fibroblastos de mujeres y hombres de 1.7:1. Los autores no atribuyen los resultados a un control hormonal; primero porque la diferencia encontrada es en cultivos realizados en condiciones idénticas y segundo, las mujeres heterocigotas tienen niveles en rangos masculinos bajos, así que cualquier forma de regulación sexo-específica no sería posible (69).

Al contrario de lo sugerido previamente, Cuevas y cols muestran diferencias significativas de la actividad de la STS en mujeres y hombres pre y post puberales. Sus resultados indican que los individuos prepuberales (2.01:1 entre mujeres y hombres) muestran una actividad enzimática mayor que la de los sujetos postpuberales (1.37:1). Estas diferencias en la actividad de la STS sugieren la posible influencia de hormonas secretadas durante la pubertad sobre la expresión de esta enzima (63).

A pesar de esta controversia, en este estudio, los resultados no son debidos a la influencia hormonal, ya que este aspecto se controló incluyendo pacientes y mujeres normales mayores de 16 años, sin terapia hormonal substitutiva o con hormonales orales, respectivamente. Por otra parte, se podría sugerir que en las mujeres 46,XX existan variaciones en la actividad de la enzima dependiendo de la etapa en que se encuentren durante el ciclo ovárico y

que esto hubiese influido en los resultados obtenidos, sin embargo, recientemente analizando la actividad de la STS para detectar heterocigotas para la deficiencia de esta enzima, los autores reportan que la actividad en leucocitos es independiente de la etapa del ciclo ovárico en el cual las células se recolectaron (96).

El síndrome de Turner es un buen modelo para analizar la influencia hormonal sobre la actividad de la enzima STS, lo que podría realizarse de dos formas, 1) tomando pacientes 45,X, sin terapia hormonal substitutiva para medir los niveles de STS y luego administrar terapia para valorar su actividad posteriormente, repitiendo el proceso incluso en varias ocasiones, o 2) comparar dos grupos de pacientes 45,X, uno sin haber tomado terapia y otro con tratamiento, para comparar la actividad enzimática de ambos.

Si se observan los resultados obtenidos en este estudio, llama la atención los valores extremos encontrados en las pacientes con 46,X,i(Xq) y 45,X (0.78 y 1.42 pmol/mg prot/h respectivamente), los cuales podrían explicar el hecho de no encontrar diferencias. Sin embargo, si estos valores son excluidos el promedio de la actividad de la STS en el grupo 46,X,i(Xq) es de 1.18 ± 0.06 y en 45,X de 0.99 ± 0.10 y al analizar nuevamente los grupos con estos resultados las diferencias continúan siendo no

significativas ($p > 0.05$). Se podría sugerir que el número de casos analizados es pequeño, y por eso se explique la igualdad de la actividad enzimática, sin embargo, de acuerdo al cálculo de tamaño de muestra, 5 pacientes por grupo serían suficientes para demostrar diferencias.

Por otra parte, para asegurar que no existían errores durante el ensayo enzimático, se incluyó posteriormente un grupo que sirviera como control para una sólo copia del gen. De esta manera, se estudiaron 13 varones pospuberales y la actividad media en este grupo fue de 0.56 ± 11 pmol/mg prot/h. Estos hallazgos indican una relación de la actividad enzimática de la STS entre mujeres y varones de este estudio de 1.6:1, lo cual concuerda con lo descrito previamente.

En estudios exclusivamente citogenéticos las frecuencias de las alteraciones del cromosoma X indican que 50 a 60% son monosomía del cromosoma X (45,X), 30 a 40% son mosaicos; de éstos 10 a 15% son 45,X/46,XX y 2 a 5% 45,X/46,XY. Las anomalías estructurales constituyen el 28%, siendo la más frecuente el i(Xq) representando 12 a 20%, en forma simple o como mosaico. La frecuencia del resto de las alteraciones es variable, pero se considera que el anillo del cromosoma X [r(X)], la deleción de brazos cortos [del(Xp)] y la deleción de brazos largos [del(Xq)] son las que siguen en frecuencia (77-79,81,82). Al realizar estudios moleculares, se ha observado que estas frecuencias son

diferentes, disminuyendo la de las monosomías (20.7%) y aumentando la de las alteraciones estructurales, principalmente la de cromosomas marcadores (45,X/46,X+mar), lo cual sugiere la posibilidad de que los casos 45,X sean en realidad mosaicos crípticos no detectados citogenéticamente (97). De acuerdo a lo anterior, en este estudio es posible la existencia de líneas celulares 46,XX en los casos de pacientes 45,X y 46,X,i(Xq) y esto explicaría que la actividad de la STS sea igual en los grupos de estudio, sin embargo, en caso de existir mosaicos la proporción de líneas celulares con 2 copias del gen sería muy baja ya que se trató de contar hasta 100 metafases por caso para descartar mosaicos y la influencia de estos en los resultados no sería importante.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Roberts DR, Lieberman S. The biochemistry of the 3 β -hydroxy- Δ 5-steroid sulfates. En: Bernstein S Solomon (eds): *Chemical and Biological Aspects of Steroid Conjugation*. Springer Verlag, New York, 1970, p219.
- 2.- Hobkirk R. Steroid sulfotransferases and steroid sulfate sulfatases: characteristics and biological roles. *Can J Biochem Cell Biol* 63: 1127, 1985.
- 3.-Payne AH, Lawrence CC, Foster DL, Jafee RB, Intranuclear binding of 17-estradiol end estrona in female ovine pituitaries following incubation with estrone sulfate. *J Biol Chem* 248: 1598, 1973.
- 4- Vignon F, Terqui M, Westley B, Derocq D, Rochefort H. Effects of plasma estrogen sulfates in mammary cancer cells. *Endocrinology* 106: 1079, 1980.
- 5.- Korth-Schultz S, Levine LS, New I, Chow DM: Dehydroepiandrosterone sulfate (DS) levels a rapid test for abnormal adrenal androgen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 42: 1005, 1976.
- 6- Riiter EO, Fuldauer VG, Root AW. Secretion of the adrenal androgen, dehydroepiandrosterone sulfate during normal infancy, childhood, and adolescence, in sick infants, and in children with endocrinology abnormalities. *J Pediatr* 90: 766, 1977.
- 7.- Peretti E, Forest MG. Patterns of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood. Evidence for testicular production. *J Clin Endocrinol Metab* 47: 572, 1978.
- 8.- Salido EC, Yen PH, Barajas L, Shapiro LJ. Steroid sulfatase expression in human placenta: immunocytochemistry and *in situ* hibridization study. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1564, 1990.
- 9.- Bergner EA, Shapiro LJ. Metabolism of ³H-Dehydroepiandrosterone sulphate by subjects with steroid sulphate deficiency. *J Inherit Metab Dis* 11: 403, 1988.

- 10.- Rose FA. The mammalian sulphatases and placental sulfatase deficiency in man. *J Inherit Metab Dis* 5: 145, 1982.
- 11.- Iwamori M, Moser HW, Kishimoto Y. Solubilization and partial purification of steroid sulfatase from rat liver: Characterization of estrone sulfate. *Arch Biochem Biophys* 174: 199, 1976.
- 12.- Dibbelt L, Kuss E. Human placental sterylsulfatase: Interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition-state analogues, amino-acid modifiers and anion transport inhibitors. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 372: 173, 1991.
- 13.- Puca AA, Zollo M, Repetto M, Andolfi G, Guffanti A, Simon G, Ballabio A, Franco B. Identification by a shotgun sequencing, genomic organization, and functional analysis of a fourth arylsulfatase gene (ARSF) from the Xp22.3 region. *Genomics* 42:192, 1997.
- 14.- Franco B, Meroni G, Parenti G, Levilliers J, Bernard L, Gebbia M, Cox L, Maroteaux P, Sheffield R, Rapold GA, Andria G, Petit C, Ballabio A. A cluster of sulfatase gene on Xp22.3; mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embriopathy. *Cell* 81: 15, 1995.
- 15.- Chang PL, Varey PA, Rosa NE, Ameen M, Davidson RG. Association of steroid sulfate with one of arylsulfatase C isozymes in human fibroblasts. *J Biol Chem* 261: 14443, 1986.
- 16.- Chang PL, Muller OT, Lafrenie RM, Varey PA, Rosa NE, Davidson RG, Henry WM, Shows TB. The human arylsulfatase-C isoenzymes: Two distincts genes that escape from X inactivation. *Am J Hum Genet* 46: 729, 1990.
- 17.- Shankaran R, Ameen M, Daniel WL, Davidson RG, Chang PL. Characterization of arylsulfatase C isozymes from human liver and placenta. *Biochim Biophys Acta* 1078: 251, 1991.
- 18.- Munroe DG, Chang PL. Tissue-specific expression of human arylsulfatase-C isozymes and steroid sulfatase *Am J Hum Genet* 40: 102, 1987.
- 19.- Daniel WL, Chang PL. Comparison of arylsulfatase C and steroid sulfatase from human placenta and liver. *Enzyme* 43: 212, 1990.

- 20.- Kawano JI, Kotani T, Othaki S, Minamino N, Matsuo H, Oinuma T, Aikawa E. Characterization of rat and human steroid sulfatases. *Biochim Biophys Acta* 997: 199, 1989.
- 21.- Yen PH, Allen E, Marsh B, Mohandas T, Wang N, Taggart RT, Shapiro LJ. Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletions in STS deficiency: Implications for X-Y interchange. *Cell* 49: 443, 1987.
- 22.- Shapiro LJ, Yen P, Pomerantz D, Martin E, Rolewic L, Mohandas T. Molecular studies of deletions at the human steroid sulfatase locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8477, 1989.
- 23.- Willemsen R, Kroos M, Hoogeveen AT, van Dongen JM, Parenti G, van der Loos CM, Reuser AJJ. Ultrastructural localization of steroid sulfatase in cultured human fibroblasts by immunocytochemistry: A comparative study with lysosomal enzymes and the mannose 6-phosphate receptor. *Histochem J* 20: 41, 1988.
- 24.- Stein C, Hile A, Seidel J, Rijnbout S, Waheed A, Schmidt B, Geuze H, von Figura K. Cloning and expression of human steroid-sulfatase. *J Biol Chem* 264: 13865, 1989.
- 25.- Cuevas Covarrubias SA, Juárez Oropeza MA, Miranda Zamora R, Díaz Zagoya JC. El ensayo enzimático de la sulfatasa esteroidea en la ictiosis ligada al X. *Rev Fac Med UNAM* 35:3, 1992.
- 26.- Epstein EH, Leventhal ME. Steroid sulfatase of human leukocytes and epidermis and the diagnosis of recessive X-linked ichtyosis. *J Clin Invest* 67: 1257, 1981.
- 27.- Conary J, Nauerth A, Burns G, Hasilik A, von Figura K. Steroid sulfatase. Biosynthesis and processing in normal and mutant fibroblasts. *Eur J Biochem* 158: 71, 1986.
- 28.- Horowitz AL, Warshawsky L, King J, Burns G. Rapid degradation of steroid sulfatase in multiple sulfatase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 389, 1986.
- 29.- Lyon MF. X Chromosome inactivation. En: *Molecular Genetics of Sex Determination*. Wachtel SS editor. Academic Press, San Diego California, 1994. p 123.
- 30.- Lyon MF. The quest for the X inactivation centre. *Trends Genet* 7: 69, 1991.

- 31.- Willard HF. The sex chromosomes and the X Chromosome inactivation. En: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*. 7th Ed Vol I. Charles Scriver editor. McGraw-Hill, 1995. p 719.
- 32.- Gartler SM, Riggs AD. Mammalian X chromosome inactivation. *Ann Rev Genet* 17: 155, 1983.
- 33.- Ballabio A, Willard HF. Mammalian X chromosome inactivation and the XIST gene. *Curr Opin Genet Dev* 2: 439, 1992.
- 34.- Borsani G, Ballabio A. X chromosome gene dosage compensation in female mammals. *Dev Biol* 4: 129, 1993.
- 35.- Takagi N, Sasaki M. Preferential inactivation of paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature* 256: 640, 1975.
- 36.- Polani PE. Pairing of X and Y chromosomes, non-inactivation of X linked genes and the maleness factor. *Hum Genet* 60: 207, 1982.
- 37.- Davies K. The essence of inactivity. *Nature* 394: 15, 1991.
- 38.- Rappold G. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet*, 92:315, 1993.
- 39.- Goodfellow P, Tippet P. A human quantitative polymorphism related to the Xg blood groups. *Nature* 289:404, 1981.
- 40.- Goodfellow P, Pym B, Mohandas T, Shapiro LJ. The cell surface antigen locus, MIC2X, escapes X inactivation. *Am J Hum Genet* 36:777, 1984.
- 41.- Gearing DP, King JA, Gough NM, Nicola NA. Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *EMBO J* 8:3667, 1989.
- 42.- Gough NM. Localization of the human GM-CSF receptor gene to the X-Y pseudoautosomal region. *Nature* 345:734, 1990.

- 43.- Schiebel K, Weiss B, Wohrle D, Rappold G. A human pseudoautosomal gene, ADP/ATP translocase, escapes X-inactivation whereas a homologue on Xq is subject to X-inactivation. *Nat Genet* 3: 82, 1993.
- 44.- Ellison J, Passage M, Yu LC, Yen P, Mohandas TK, Shapiro L. Direct isolation of human genes that escape X inactivation. *Sommat Cell Mol Genet* 18:259, 1992.
- 45.- Mohandas T, Shapiro LJ, Sparkes RS, Sparkes MC. Regional assignment of the steroid sulfatase X linked ichthyosis locus: Implications for non inactivated region on the short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5779, 1979.
- 46.- Muller CR, Westerveld A, Migl B, Franke W, Ropers HH. Regional assignment of the gene locus for steroid sulfatase. *Hum Genet* 54: 201, 1980.
- 47.- Tieppolo L, Zuffardi O, Fraccaro M, di Natale D, Gargantini L, Muller CR, Ropers HH. Assignment by deletion mapping of the steroid sulfatase X linked ichthyosis locus to Xp22.3. *Hum Genet* 54: 205, 1980.
- 48.- Ballabio A, Andria G. Deletion and translocations involving the distal short arm of the human X chromosome: Review and hypothesis. *Hum Mol Genet* 1: 221, 1992.
- 49.- Bick D, Franco B, Sherins RJ. Intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *N Engl J Med* 326:1752, 1992.
- 50.- Hardelin JP, Levilliers J, Blanchard S. Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet* 2:373, 1993.
- 51.- Lee WC, Salido E, Yen P. Isolation of a new gene GS2 (DXS1283E) from a CPG island between STS and KAL1 on Xp22.3. *Genomics* 22: 372, 1994.
- 52.- Shneider GA, Beer-Romero P, Brown LG. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 57:1247, 1989.
- 53.- Brown CJ, Powers VE, Munroe DL. A gene on the short arm of the human X chromosome complements the murine tsA1S9 DNA synthesis mutation. *Somatic Cell Mol Genet* 15: 173, 1989.

- 54.- Brown CJ, Miller AP, Carrel L, Rupert JL, Davies KE, Willard H. The DXS423E gene in Xp11.21 escapes X chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 4:251, 1995.
- 55.- Fisher E, Beer-Romero P, Brown LG. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escapes from inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* 63:1215, 1990.
- 56.- Brown JC, Ballabio A, Rupert LJ. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349: 38, 1991.
- 57.- Brown JC, Lafreniere R. Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13.1. *Nature* 349:82, 1991.
- 58.- Fraser N, Ballabio A, Zollo M, Persico MG, Craig I. Identification of incomplete coding sequences for steroid sulfatase on human Y chromosome: Evidence for an ancestral pseudoautosomal gene? *Development* 101: 127, 1987.
- 59.- Yen PH, Marsh B, Allen E, Mohandas T, Shapiro LJ. Organization of the steroid sulfatase gene and sequence homology between the X and the Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 41: 248, 1987.
- 60.- Bardoni B, Zuffardi O, Guioli S, Ballabio A, Simi P, Cavalli P, Grimoldi MG, Fraccaro M, Camerino G. A deletion map of the human Yq11 region: Implication for the evolution of the Y chromosome and tentative mapping of a locus involved in spermatogenesis. *Genomics* 11: 443, 1991.
- 61.- Yen PH, Marsh B, Allen E, Tsai SP, Ellison J, Connolly L, Neiswanger K, Shapiro LJ. The human X linked steroid sulfatase gene and Y encoded pseudogene: Evidence for an inversion of the Y chromosome during primate evolution. *Cell* 55: 1123, 1988.
- 62.- Ballabio A, Shapiro LJ. Steroid sulfatase deficiency and X-linked ichthyosis. En: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*. 7th Ed Vol II. Charles Scriver editor McGraw-Hill, 1995 p 2999.
- 63.- Cuevas SA, Juárez MA, Miranda R, Díaz JC. Comparative analysis of human steroid sulfatase activity in prepubertal and postpubertal males and females. *Biochem Mol Biol Inter* 30: 691, 1993.

- 64.- Shapiro LJ, Mohandas T, Weiss R, Romeo A. Noninactivation of an X chromosome locus in man. *Science* 204: 1224, 1979.
- 65.- Migeon BR, Shapiro LJ, Norum RA, Mohandas T, Axelman J, Dabora RC. Differential expression of the steroid sulfatase locus on the active and inactive human X chromosome. *Nature* 299: 838, 1982.
- 66.- Shapiro LJ, Mohandas T. DNA methylation and the control of gene expression on the human X chromosome. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 47: 631, 1983.
- 67.- Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Genetic evidence for inactivation of an autosomal locus attached to an inactive X chromosome. *Am J Hum Genet* 34: 811, 1982.
- 68.- Mohandas T, Geller RL, Yen PH, Rosendorff J, Bernstein R, Yoshida A, Shapiro LJ. Cytogenetic and molecular studies on a recombinant human X chromosome: Implications for the spreading of X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4954, 1987.
- 69.- Muller CR, Migl B, Traupe H, Ropers HH. X-linked steroid sulfatase: Evidence for different gene dosage in males and females. *Hum Genet* 57: 197, 1980.
- 70.- Ropers HH, Migl B, Zimmer J, Fraccaro M, Maraschio PP, Westerveld A. Activity of steroid sulfatase in fibroblast with numerical and structural X chromosome aberrations. *Hum Genet* 51: 354, 1981.
- 71.- Craig IW, Tolley E. Steroid sulphatase and the conservation of the mammalian X chromosomes. *Trends Genet* 2: 201, 1986.
- 72.- Muller CR, Migl B, Ropers HH, Happle R. Heterozygote detection in steroid sulfatase deficiency. *Lancet* 1: 546, 1980.
- 73.- Bedin M, Weil D, Fournier T, Cedar L, Frezal J. Biochemical evidence for the non-inactivation of the steroid sulfatase locus in human placenta and fibroblasts. *Hum Genet* 59: 256, 1981.
- 74.- Lykkesfeldt G, Bock E, Lykkesfeldt AE. Sex specific difference in placental steroid sulphatase activity. *Lancet* 2: 256, 1981.

- 75.- Chance PF, Gartler SM. Evidence for a dosage effect at the X-linked steroid sulfatase locus in human tissues. *Am J Hum Genet* 35: 234, 1983.
- 76.- Dancis J, Jansen V, Hutzler J. Hair root analysis in X-linked ichthyosis. *J Inherit Metab Dis* 6: 173, 1983.
- 77.- Lippe B. Turner syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 20: 121, 1991.
- 78.- Lawrence C, et al. The genetics of hypogonadism. *Reprod Genet* 5: 53, 1994.
- 79.- Davee M, et al. Turner syndrome. En *Birth Defects Encyclopedia*. Blackwell Scientific Publications INC. Center for Birth Defects Information Services. 1991, p 1717.
- 80.- Grumbach MM, Conte FA. Disorders of sex differentiation. En *Textbook of Endocrinology*. Ed WB Saunders Company. Philadelphia, 1992 p 853.
- 81.- Hall J, Gilchrist DM. Turner syndrome and its variance. *Pediatr Clin North Am* 37: 1421, 1990.
- 82.- Shapiro L. Phenotypic expressions of numeric and structural X chromosome abnormalities. En: *Cytogenetics of the mammalian X chromosome, Part B: X anomalies and their clinical manifestations*. Alan R Liss INC New York, 1983, p 321.
- 83.- Zinn AR, Page DC, Fisher EMC. Turner syndrome: The case of the missing sex chromosome. *Trends Genet* 9: 90, 1993.
- 84.- Hook EB, Warburton D. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: Livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet* 64: 24, 1983.
- 85.- Thompson M. *Genetics in Medicine*. 5th ed WB Saunders Company, 1991.
- 86.- Feinstein AR. Clinical Biostatistics XXXIV. The other side of statistical significance: alpha, beta, delta and the calculation of sample size. *Clin Pharmacol Ther* 18: 491, 1975.

- 87.- Dawson Saunders B. Estimating and comparing means. En *Basic and Clinical Biostatistics*. Appleton & Lange 1990 p 99.
- 88.- Stata corp. Stata Statistical software: Release 5.0 College Station, TX: Stata Corporation.
- 89.- Verma R, Babu A. Specialized techniques. En: *Human Chromosomes. Manual of Basic Techniques*. Ed Pergamon Press INC 1st ed, 1989 p 4, 191.
- 90.- Ting A, Morris PJ. A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood. *Vox Sang* 20: 561, 1971.
- 91.- Nitsch M, Gabruelcic D, Tschesche H. Separation of granule subpopulations in human polymorphonuclear leukocytes. *Biol Chem* 371: 611, 1990.
- 92.- Ropers HH, Wiberg U. Evidence for X-linkage and non-inactivation of steroid sulphatase locus in wood lemming. *Nature* 296: 766, 1982.
- 93.- Keitges E, Rivest M, Siniscalco M, Gartler SM. X linkage of steroid sulphatase in the mouse is evidence for a functional Y-linked allele. *Nature* 315: 226, 1985.
- 94.- Keitges E, Gartler SM. Dosage of the Sts gene in the mouse. *Am J Hum Genet* 39: 470, 1986.
- 95.- Gartler SM, Rivest M. Evidence for X-linkage of steroid sulfatase in the mouse: steroid sulfatase levels in oocytes of XX and XO mice. *Genetics* 103: 137, 1983.
- 96.- Lowis EI, Oakey RE. Steroid sulphatase deficiency: identification of heterozygotes using hydrolysis of dehydroepiandrosterone sulphate by peripheral leucocytes. *Ann Clin Biochem* 33: 219, 1996.
- 97.- Held KR, Kerber S, Kaminski E. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: Does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes. *Hum genet* 88:288, 1992.

ANEXO I**CARTA DE CONSENTIMIENTO PARA PACIENTES**

México D.F. a de de 199

A Quien Corresponda:

Por medio de la presente hago de su conocimiento que he dado mi consentimiento para participar en el estudio "Comparación de la Actividad de Sulfatasa de Esteroides en Pacientes con Isocromosoma de Brazos Largos del Cromosoma X con Pacientes con Monosomía y Mujeres Normales", a cargo del Dr. Antonio Miranda Duarte, que se realiza en el Hospital General de México S.Sa., lo cual he aceptado en forma libre y voluntaria.

Previamente se me ha explicado en forma satisfactoria, que el procedimiento consiste en la toma de una muestra de sangre de 10 ml para ensayo enzimático por medio de punción venosa, con un riesgo mínimo para mi persona como podría ser la formación de un hematoma.

Entiendo que de este estudio se derivará como beneficio el desarrollo de procedimientos diagnósticos más eficientes y el mejor conocimiento de mi padecimiento.

Así mismo, estoy en libertad de retirarme del presente estudio en el momento que lo desee. También puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio, en caso de que decidiera retirarme la atención que recibo como paciente en esta institución no se verá afectada.

Nombre: _____

Firma: _____

Responsable del estudio: _____

Dr. Antonio Miranda Duarte

ANEXO II

CARTA DE CONSENTIMIENTO PARA MUJERES NORMALES

México D.F. a de de 199

A Quien Corresponda:

Por medio de la presente hago de su conocimiento que he dado mi consentimiento para participar en el estudio "Comparación de la Actividad de Sulfatasa de Esteroides en Pacientes con Isocromosoma de Brazos Largos del Cromosoma X con Pacientes con Monosomía y Mujeres Normales", a cargo del Dr. Antonio Miranda Duarte, que se realiza en el Hospital General de México S.Sa., lo cual he aceptado en forma libre y voluntaria.

Previamente se me ha explicado en forma satisfactoria, que el procedimiento consiste en la toma de dos muestras de sangre, la primera de 5 ml para realizar el cariotipo y la segunda de 10 ml para ensayo enzimático, ambas por medio de punción venosa, con un riesgo mínimo para mi persona como podría ser la formación de un hematoma.

Entiendo que de este estudio se derivará como beneficio el desarrollo de procedimientos diagnósticos más eficientes y el mejor conocimiento de algunos padecimientos.

Así mismo, estoy en libertad de retirarme del presente estudio en el momento que lo desee. También puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio.

Nombre: _____

Firma: _____

Responsable del estudio: _____

Dr. Antonio Miranda Duarte

CARACTERISTICAS CLINICAS

Craneofacial

Cara triangular	---
Ptosis palpebral	---
Fisuras palpebrales antimongoloides	---
Epicanto	---
Pabellones auriculares anormales	---
Pabellones de implantación baja	---
Pabellones auriculares prominentes	---
Hipoplasia mediofacial	---
Microretrognatia	---
Paladar alto y arqueado	---
Dentición anormal	---
Estrabismo	---
Nistagmo	---
Ceguera a los colores	---
Valoración oftalmológica: _____	_____

Defectos auditivos

Valoración auditiva: _____	---
----------------------------	-----

Cuello

Pterygium colli	---
Ancho	---
Corto	---
Línea de implantación de cabello baja	---
Esqueléticas (Si es necesario tomar placas de Rx)	---
Clinodactilia de 5° dedo	---
Acortamiento de 4° metacarpiano	---
Cubitus valgus	---
Escoliosis	---
Falta de lordosis lumbar	---
Genu valgum	---
Acortamiento de 4° metatarsiano	---
Osteoporosis	---
Edad osea: _____	_____
Otras alteraciones: _____	_____

Tórax

Contorno rectangular (En escudo)	---
Teletelia	---

Piel y linfáticos

Nevos pigmentados

Hirsutismo facial

Cicatrices hipertróficas

Uñas hipoplásicas

Uñas malformadas

Linfedema

Otras alteraciones: _____

DESARROLLO SEXUAL

Desarrollo mamario: Estadio de Tanner I II III IV V

Vello pubiano: Estadio de Tanner I II III IV V

Genitales infantiles

Clitoromegalia

Labios mayores hipoplásicos

Labios mayores pigmentados

Labios menores hipoplásicos

Labios menores ausentes

Otras características: _____

SOMATOMETRIA

Tensión arterial: _____

	Medida	Percentila
Peso	_____	_____
Talla	_____	_____
Perímetro cefálico	_____	_____
Brazada	_____	_____
Perímetro taracico	_____	_____
Segmento superior	_____	_____
Segmento inferior	_____	_____
Relación SS/SI	_____	_____

Valoración cardiovascular: _____

Valoración renal (USG y en caso necesario urografía excretora): _____

USG Pelvico: _____

LABORATORIO

Hormonales

FSH: _____

LH: _____

Estrogenos: _____

Progesterona: _____

Química Sanguínea

Glucosa: _____

Tolerancia oral a la glucosa: _____

Citogenética

Técnica

Habitual: _____

Bandas G: _____

Bandas C: _____

Otros _____

Observaciones _____