

11245

97



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARÍA DE SALUD  
CENTRO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

INSTITUTO DE ORTOPEDIA  
SERVICIO DE GENÉTICA

"ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SULFATASA DE ESTEROIDES  
EN LEUCOCITOS DE MUJERES MEXICANAS,  
EN ESTADO PRE Y POSMENOPÁUSICO"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MÉDICO ESPECIALISTA EN ORTOPEDIA**  
P R E S E N T A :

**DR. DRUSSO LÓPEZ ESTRADA**

ASESOR: DR. EN C. MARGARITA VALDÉS FLORES



MÉXICO D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Dr. Luis Guillermo Ibarra**  
**Director General del Centro Nacional de Rehabilitación**

**Dr. Juan A. Madinaveitia Villanueva**  
**Director General Adjunto del**  
**Instituto de Ortopedia**

**Dr. Antonio León Pérez**  
**Subdirector de Investigación y Enseñanza**

**Dr. Saul Renán León Hernández**  
**Jefe de la División de Enseñanza**

**Dr. Luis Gómez Velásquez**  
**Jefe de Enseñanza Médica**

**Dr. José Manuel Aguilera Zepeda**  
**Profr. Titular del Curso de Ortopedia**  
**en el Centro Nacional de Rehabilitación**

**Dr. en C. Margarita Valdés Flores**  
**Directora de Tesis**  
**Médico Adscrito al Servicio de Genética**



SECRETARÍA DE SALUD  
SUBSECRETARÍA DE SERVICIOS DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE ORTOPEdia  
SUBDIRECCIÓN DE ENSEÑANZA  
E INVESTIGACIÓN

SUBSECRETARÍA DE SERVICIOS DE SALUD  
DIVISIÓN DE SERVICIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNAM

**TESIS CON**  
**FALLA DE ORIGEN**

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la actividad de la enzima sulfatasa de esteroides (SE) en leucocitos de un grupo de 10 mujeres premenopáusicas y de 11 posmenopáusicas, mediante espectrofotometría de centelleo de líquidos. Se analizaron 10 muestras de pacientes premenopáusicas y 11 muestras de pacientes posmenopáusicas. La edad promedio del grupo de premenopáusicas fue de 35.5 años (23-50 años) y la edad promedio de las posmenopáusicas fue de 64.36 años (51-80 años). El valor promedio de actividad de la SE (expresado en pmol/mg/prot/hr) fue para las premenopáusicas de 0.45 (0.21-0.83), con una desviación estandar para los datos de 0.26. En el caso de las posmenopáusicas el valor promedio de fue de 0.89 (0.69-1.11), con una desviación estándar para estos últimos datos de 0.13. El análisis estadístico se realizó con una comparación de medias para grupos independientes, usando el análisis de U Mann Whitney, obteniendo una diferencia con una significancia de .001. No se observó una distribución normal para los datos obtenidos en uno o en otro grupo. Al buscar la correlación de la edad con la actividad de la enzima, mediante el método estadístico de Parson se encontro un valor de 0.79. Los resultados sugieren que la edad y como consecuencia el estado hormonal, guardan relación con los niveles de actividad de las diferentes enzimas implicadas en el metabolismo de hormonas esteroideas.

## ÍNDICE

ANTECEDENTES.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
OBJETIVOS.....	8
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	8
MATERIAL Y METODOS.....	9
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN.....	18
REFERENCIAS.....	21

## ANTECEDENTES

En los últimos años el estudio del papel de las hormonas esteroideas y sus receptores, particularmente estrógenos y andrógenos; sobre el metabolismo y fenotipo óseo, ha cobrado gran importancia. Diversos trabajos han mostrado que los estrógenos participan en los procesos de formación y remodelación ósea. Aparentemente, algunos de sus mecanismos de acción más importantes se relacionan con la supervivencia de los osteoblastos a través de la acción mediada por citocinas y otros factores de crecimiento. Se sabe incluso que acciones estrogénicas en tejidos diferentes al hueso repercuten sobre el fenotipo óseo. Por otra parte, andrógenos como dehidrotestosterona (DHT) y dehidroepiandrosterona (DHEA) se han relacionado en forma importante con la proliferación osteoblástica (1-5).

Trabajos recientes sugieren que estos andrógenos son capaces de incrementar los niveles de RNAm de factores de crecimiento como el factor de crecimiento II similar a la insulina (IGF- II) e interleucina 6. Cabe señalar que estudios *in vitro* han mostrado que las células óseas son capaces de responder de manera distinta a las concentraciones de estas hormonas esteroideas. Del mismo modo, está bien definido que gracias a la actividad de algunas aromatasas (i.e., 5 $\alpha$ -reductasa y 17  $\beta$ -hidroxilasa), y muy posiblemente sulfatasas (i.e., sulfatasa de esteroides) los andrógenos séricos pueden ser convertidos a o-estrógenos, esto en tejido óseo humano, de tal forma que el hueso es un tejido sensible a la acción de los esteroides sexuales. El efecto *in vivo* de estos compuestos podría depender de factores como concentración de los substratos, cantidad y disponibilidad de los receptores y concentraciones de las enzimas implicadas en estos procesos (6-7).

### **Enzima Sulfatasa de Esteroides**

La SE también conocida como arilsulfatasa C (ASC) o esteril-sulfato sulfohidrolasa (EC 3.1.6.2) es una de las 6 arilsulfatasas identificadas en los tejidos humanos (A, B, C, D, E y F). Se localiza en el retículo endoplásmico rugoso, unida a la membrana microsomal, en la cisterna de Golgi, estructuras endocíticas y sobre todo en microsomas. Estudios inmunológicos muestran presencia de la enzima en la membrana plasmática, especialmente en proyecciones celulares y microvellosidades. La SE tiene un peso molecular de 65,492 Da, muestra una distribución ubicua y se ha detectado en vagina, endometrio, ovario, próstata con hipertrofia benigna y células cancerosas de mama. Su pH óptimo oscila entre 6.5-7.5, su  $K_m$  es de  $0.8\mu M$  para el sulfato de estrona, de  $1.7\mu M$  para el sulfato de dehidroepiandrosteona y de  $0.6\mu M$  para el sulfato de testosterona. Esta arilsulfatasa cataliza la hidrólisis del radical sulfato de los 3-beta-hidroxiesteroides sulfatados (i.e. sulfatos de colesterol, estrona, testosterona, pregnenolona y dehidroepiandrosterona). La enzima es estable a las alteraciones de pH, calor y exposición a urea (8-9).

La SE está compuesta por 583 aminoácidos, los primeros 22 corresponden al péptido líder el cual es escindido postranscripcionalmente para dar origen a la proteína madura. El primer aminoácido (aa) de esta proteína corresponde a una metionina y los residuos serina <sup>21</sup>, histidina <sup>22</sup> o bien alanina <sup>23</sup> y alanina <sup>24</sup> representan las señales de reconocimiento de la peptidasa encargada de escindir la señal líder. Este proceso dura aproximadamente dos días y la vida media de esta enzima se ha estimado en 4 días (8-10).

La SE presenta las características de una glicoproteína integrada a membrana, presenta cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (residuos de asparagina "N" en las posiciones 47, 259, 333 y 459), sin embargo, sólo dos son utilizados (N<sup>47</sup> y N<sup>259</sup>). Esta enzima tiene además las características de una proteína integrada a membrana y el modelo propuesto para su topología muestra la presencia de dos dominios hidrofóbicos de 53 y 30 residuos cada uno (aminoácidos 185-211 y 213-237). Se ha sugerido que el sitio activo de la enzima corresponde a un residuo de histidina ubicado en la posición 136 (H<sup>136</sup>), dicho aminoácido es uno de los que muestran gran conservación evolutiva, esto con respecto a la familia génica de las arilsulfatasas. Por otra parte, se ha considerado que el sitio de unión a los diferentes ligandos se ubica en el extremo COOH de la proteína. La SE activa está formada por múltiples subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 63 kDa, siendo el agregado activo más pequeño un dímero de 126 kDa que incluye dos de los sitios potenciales de N-glicosilación (N<sup>47</sup>, N<sup>259</sup>). Aparentemente, durante el ciclo de vida de la enzima el tamaño del dímero se reduce a 61 kDa. Estudios computarizados sugieren que el primer dominio muestra una estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice, la cual se encuentra interrumpida por un residuo de prolina en la posición 212, generando así dos segmentos de 27 y 25 aa cada uno. El segundo dominio corresponde al de una hoja  $\beta$ -plegada. Los extremos amino y carboxilo terminal se ubican en la parte luminal de la membrana, ambos contienen una cadena de oligosacáridos y se comunican por medio de un dominio hidrofóbico que comprende dos secuencias que se extienden en direcciones opuestas de la membrana. La estabilidad de la SE en los microsomas se ha relacionado con la gran homología que sus dos dominios transmembranales guardan con otras sulfatasas lisosomales (arilsulfatasas A y B) (10-11).



La SE comprende dos isoformas que están codificadas por genes diferentes, localizados en los brazos cortos del cromosoma X. Tomando en cuenta su movilidad electroforética estas isoformas se clasifican en "s" o lenta (slow-migrating) y "f" o rápida (fast-migrating), sin embargo, únicamente la forma "s" corresponde a la SE. La expresión de estas variantes electroforéticas es tejido específica. La forma "s" es abundante en placenta, corazón, músculo esquelético, tiroides y glándula suprarrenal y la forma "f" se encuentra presente en hígado, páncreas, riñón y tiene solamente el 2-7% de la actividad de la SE. Es importante señalar que ambas isoformas muestran diferente especificidad a sustrato, labilidad al calor, estructura proteica, pH óptimo y propiedades antigénicas. Recientemente se ha sugerido que la SE juega un papel importante en la embriogénesis del ratón, sobre todo en procesos relacionados con el desarrollo de SNC (10-13).

En los últimos años la actividad de la SE se ha relacionado con los procesos de formación y remodelación ósea. Estudios de inmunohistoquímica han identificado la presencia de SE en el citoplasma de las células epiteliales de trompas de falopio en diferentes fases del ciclo menstrual, predominando durante la fase lútea. Se ha sugerido que la SE participa en la regulación local de síntesis de esteroides y posiblemente en la función reproductiva de las trompas de falopio. Estudios en ratas demuestran que el uso de inhibidores de la SE (sulfamatos) modifica el perfil de presión sanguínea en estos animales de laboratorio (5, 8-15).

## **GEN STS**

La actividad de la enzima SE está asociada a un gen único en humanos (gen STS). Este gen se extiende sobre una región de 146 kb en el cromosoma X (Xp22.3), muy cerca de

la región pseudoautosómica. Contiene 10 exones de tamaño variable y dos regiones, una de por lo menos 206 pares de bases en el extremo 5' y otra en el extremo 3' de 668 pares de bases. Tiene, además, una señal de poliadenilación (AATAAA) 13 pares de bases antes del comienzo de la cola de poli-A. Aparentemente, la región promotora del gen STS es pobre en secuencias GC y parece ser que carece de sitios de unión a factores de transcripción conocidos. Por otra parte, se ha identificado una región de aproximadamente 1.3 kb en el extremo 5' que contiene varios sitios de unión potencial para factores de transcripción, entre éstos se encuentran 3 elementos potenciadores (URE1-3) y un elemento represor (URE4). Se han identificado además tres transcritos primarios en distintas líneas celulares, cada uno con pesos moleculares diferentes (2.7, 5.2 y 7.2 Kb) que parecen ser consecuencia de la adición de colas de poli-A de longitud variable y no del procesamiento alternativo del producto génico primario. Hasta este momento, no se ha definido aún la función de cada uno de estos transcritos (16-18).

## **MENOPAUSIA Y OSTEOPOROSIS.**

Según la Sociedad Internacional de Menopausia se define menopausia (del griego *menós*, mes y *pausis*, cese) se define como: "la última hemorragia menstrual en ausencia de enfermedad y embarazo, pero como esta fecha se establece de manera retrospectiva, después de un año de amenorrea, se puede considerar como menopausia todo ese año a partir de la última menstruación". Actualmente la edad de presentación es alrededor de los 50 años (19-21).

Se ha sugerido también que la reducción posmenopáusica en la actividad de las enzimas relacionadas con la producción ósea de estrógenos podría guardar relación con los procesos fisiopatológicos de la osteoporosis. Una de las enzimas que participa de manera normal en el metabolismo de hormonas esteroideas es la sulfatasa de esteroides (SE). Con relación al desarrollo esquelético algunos trabajos han demostrado la presencia de grandes cantidades de RNAm de SE en tejido cartilaginoso durante el proceso de embriogénesis. Esto coincide con la aparición de los centros de osificación. Es posible que la enzima participe también en los procesos de formación y remodelación ósea (1-4).

Finalmente, análisis densitométricos in vivo sugieren que la menopausia acelera la pérdida ósea y que esta se puede prevenir mediante la terapia estrogénica de reemplazo. Sin embargo, si la menopausia representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de osteoporosis resulta difícil entender por que ésta entidad no se desarrolla en todas las mujeres posmenopáusicas. Esto podría deberse a que después de la menopausia la fuente de estrógenos es la corteza adrenal y no los ovarios. De esta manera, las concentraciones séricas de estrógenos pueden no reflejar la concentración ósea de los mismos, ya que la ubicuidad de la distribución de la enzima SE, puede contribuir a mantener su expresión funcional, aportando formas activas de esteroides, mediante la desulfatación; que como ya se cito se sabe que participan en la formación y remodelación ósea (1-4). Sin embargo, no se han descrito los valores de la actividad de la enzima SE en tejidos de mujeres adultas pre y posmenopáusicas. Siendo que de los elementos formes de la sangre los leucocitos se sabe que la expresan. Por la accesibilidad que se puede tener a éste tejido, mediante extracción de unos cuantos ml

de sangre (aprox. 10ml), resultaría interesante conocer su comportamiento en leucocitos.

## JUSTIFICACIÓN

Con base en los antecedentes ya presentados consideramos que el estudio del metabolismo óseo desde los puntos de vista bioquímico y molecular en particular con relación a la síntesis y metabolismo de hormonas esteroideas resulta de gran interés para los diversas áreas de la actividad biomédica (ginecología, ortopedia, rehabilitación, bioquímica ósea y genética). Este trabajo nos permitirá conocer mejor el papel de una de las enzimas más importantes en la síntesis y metabolismo de hormonas esteroideas (i.e. sulfatasa de esteroides) y su relación con el metabolismo óseo, esto ayudaría a comprender mejor la fisiopatología de padecimientos de la mujer en la edad adulta con estados de degradación ósea alterados (como es la osteoporosis), cuya repercusión en las actividades socio-económicas de la población soy muy elevadas.

En el Centro Nacional de Rehabilitación se cuenta con la disponibilidad de pacientes femeninos en estadio pre y posmenopáusico que pueden participar en el estudio, reuniendo los criterios de inclusión, y aportando unos pocos ml (10ml) de sangre, en donde se puede caracterizar la actividad de la enzima en leucocitos y se cuenta también con la infraestructura humana y técnica para la realización del proyecto, además del consentimiento del comité de investigación del centro. Si se encuentra alguna diferencia significativa en esta primera exploración, puede darse paso a investigaciones específicas en donde se pueda establecer la curva normal de actividad de la enzima SE para la población femenina adulta joven y sana y la actividad de la enzima en estados de degradación ósea alterados, como es la osteoporosis.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Cómo se encuentran la actividad de la enzima sulfatasa de esteroides en leucocitos, de un grupo de mujeres adultas mexicanas en estadio pre y posmenopáusico?.

## **OBJETIVO GENERAL**

Conocer cómo se encuentra la actividad de la enzima sulfatasa de esteroides en leucocitos de un grupo de mujeres adultas mexicanas pre y posmenopáusicas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Medir la actividad de la enzima SE en leucocitos, mediante espectrofotometría de centelleo de líquidos en un grupo de mujeres adultas mexicanas premenopáusicas.

Cuantificar la actividad de la enzima SE en leucocitos, mediante espectrofotometría de centelleo de líquidos en un grupo de mujeres adultas mexicanas posmenopáusicas.

## **DISEÑO DE LA INVESTIGACION**

Estudio biomédico piloto, observacional descriptivo, transversal y analítico.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Mujeres adultas mexicanas pre y posmenopáusicas, atendidas en el Centro Nacional de Rehabilitación (Instituto de Ortopedia).

### **MUESTRA DE ESTUDIO.**

Por tratarse de un estudio piloto se estudiaron 2 grupos de mujeres (10 mujeres premenopáusicas y 11 mujeres posmenopáusicas).

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

- a).- Mujeres de más de 20 años atendidas en el CNR.
- b).- Que aceptaron participar en el estudio mediante carta de consentimiento informado.

### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

- a).- Mujeres con patología ósea displásica.
- b).- Mujeres con menopausia temprana.
- c).- Mujeres bajo tratamiento hormonal sustitutivo.

## VARIABLES DE ESTUDIO

### **Variable Independiente:**

Mujeres adultas mexicanas en estadios de pre y posmenopausia.

#### *Definición conceptual:*

Una mujer fue considerada mexicana, si existió el antecedente de tres generaciones previas, nacidas en el país.

Según la Sociedad Internacional de Menopausia se define menopausia (del griego *menós*, mes y *pausis*, cese) se define como: "la última hemorragia menstrual en ausencia de enfermedad y embarazo, pero como esta fecha se establece de manera retrospectiva, después de un año de amenorrea, se puede considerar como menopausia todo ese año a partir de la última menstruación". La edad promedio de presentación es alrededor de los 50 años.

#### *Definición operacional:*

La muestra sanguínea, fue obtenida de pacientes que reúnan los criterios de inclusión, mujeres adultas mexicanas pre y pos menopáusicas.

El estadio pre y posmenopáusico fue determinado por interrogatorio directo de historia clínica ginecológica de acuerdo al criterio de la Sociedad Internacional de Menopausia.

**Variable dependiente.**

Actividad de la enzima sulfatasa de esteroides en tejido óseo de mujeres adultas mexicanas, pre y posmenopáusicas.

*Definición conceptual.*

La actividad de la enzima se evaluó mediante la desulfatación del substrato DHEAS marcado con tritio.

*Definición operacional.*

Se midió incubando una reacción empleando como substratos los sulfatos de dehidroepiandrosterona y estrona marcados con tritio. Posteriormente ésta se leyó en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en pmol/mg/prot/hora. Y se valoró al darse los resultados si hubo actividad de la enzima o no y en que valores estuvo la actividad.



## **PROCEDIMIENTO**

1) Se eligió de manera consecutiva a los pacientes que reunieron criterios de inclusión, durante el periodo de captación de diciembre del 2001 a febrero del 2002. Realizada por el titular del proyecto.

2) Se realizó una historia clínica para determinar las condiciones ginecológicas de los pacientes y se clasificarán de acuerdo a los criterios de la OMS para establecer el estadio pre o posmenopáusico. Realizada por el titular del proyecto.

3) Las muestras de sangre se obtuvieron de mujeres posmenopáusicas y premenopáusicas atendidas en el CNR. La obtención de una pequeña muestra de sangre no representa un problema técnico ni resulta nocivo para la paciente. El titular del proyecto recolectó las muestras a las pacientes candidatas a participar en el estudio.

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SE (22-23).**

Para este fin, las muestras obtenidas se procesaron en forma independiente y de la siguiente manera en el Centro Nacional de Rehabilitación:

La muestra de leucocitos se resuspende en 1ml de amortiguador tris 0.014M (pH 7.0), las células se fragmentan empleando un Politrón T-100 con vástago del número 10, a la velocidad máxima en dos ciclos, de 20 y 10 segundos, respectivamente. Al incubar la reacción se utilizarán como sustratos de la enzima los sulfatos de dehidroepiandrosterona y estrona marcados con tritio ( $\mu\text{l}$ , 33 nmol), para obtener como

producto final a la dehidroepiandrosterona y estrona. Las reacciones se realiza en 200  $\mu$ l a 37° C, pH 7 por 1 hora.

Con el propósito de detener la reacción y extraer el producto final se añade 1 ml de benceno frío (Merck, grado analítico), agitándose vigorosamente en vortex durante 2 minutos y centrifugándose 5 minutos a 2500 r.p.m. Posteriormente, de la fase superior (sobrenadante de benceno), se obtienen 600  $\mu$ l, a los cuales se les añaden 5 ml de líquido de centelleo para posteriormente ser leídos por espectrofotometría de centelleo de líquidos. Este último paso se realizará en el laboratorio de genética del Hospital General de México, por el titular del proyecto y el personal técnico de dicho laboratorio.

Para validar la prueba cada uno de los ensayos se realizó por duplicado y contra tubos blanco.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se describen inicialmente, mediante medidas de tendencia central, buscando una curva de distribución. Posteriormente, se realizó una comparación de medias para grupos independientes y se analizó la relación que pueda tener el factor edad con los resultados.

**RECURSOS:**

El estudio fue respaldado por el proyecto 34767-M, que el CONACYT financía en el CNR.

*Humanos:*

Tutora: Dra. en C. Margarita Valdés Flores

Personal del laboratorio de Genética Ortopédica del INO y el titular del proyecto.

*Materiales:*

Los tubos, jeringas, medios de transporte del biológico y reactivos fueron proporcionados por el Centro de investigación del CNR, INO.

*Equipos.*

Los equipos de fragmentación celular, espectrofotómetro, centrifugación, fueron proporcionados por los laboratorios de genética del CNR y el Hospital General de México.

## RESULTADOS

Se analizaron 10 muestras de pacientes premenopáusicas y 11 muestras de pacientes posmenopáusicas. La edad promedio del grupo de premenopáusicas fue de 35.5 años (23-50 años) (Fig.1) y la edad promedio de las posmenopáusicas fue de 64.36 años (51-80 años) (Fig.2). El valor promedio de actividad de la SE, expresado en pmol/mg/prot/hr, para las premenopáusicas fue de 0.45 (0.21-0.83) (TABLA 1), con una desviación estándar para los datos de 0.26; en el caso de las posmenopáusicas el valor promedio de fue de 0.89 (0.69-1.11) (TABLA 2), con una desviación estándar para estos últimos datos de 0.13. El análisis estadístico se realizó con una comparación de medias para grupos independientes, con el programa SPSS v.10.0 para windows, usando el análisis de U Mann Whitney, obteniendo una diferencia con una significancia de .001 (TABLA 3) (Fig.3). No se observó una distribución normal para los datos obtenidos en uno o en otro grupo. Al buscar la correlación de la edad con la actividad de la enzima, mediante el método estadístico de Parson se encontro un valor de 0.79.

**TABLA 1**  
Resultados de la actividad de la SE  
en las mujeres premenopáusicas.

PACIENTE	EDAD	CPM* PROMEDIO	pmol/mg/prot/hr
1	23	1638	0.21
2	27	1385.5	0.23
3	28	1603	0.22
4	29	2872	0.356
5	30	3436	0.35
6	37	2514.5	0.83
7	43	1538.5	0.82
8	43	1014	0.8
9	45	2580.5	0.467
10	50	1948.5	0.279
<b>Promedio</b>	<b>35,5</b>	<b>2053.05</b>	<b>0.454</b>

\* cuentas por minuto

TABLA 2

Resultados de la actividad de la SE  
en mujeres posmenopáusicas.

PACIENTE	EDAD	CPM* PROMEDIO	pmol/mg/prot/hr
1	51	4621	0.92
2	55	3096.5	0.92
3	57	3664	0.73
4	60	3646	0.69
5	63	2801	0.94
6	63	4860	0.99
7	65	4853	0.84
8	67	3317.5	0.86
9	72	5034	1.11
10	75	8639	1.08
11	80	5169.5	0.76
<b>Promedio</b>	<b>64.36</b>	<b>4518.31</b>	<b>0.8945</b>

\*cuentas por minuto

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Relación edad de premenopáusicas  
y actividad de la SE

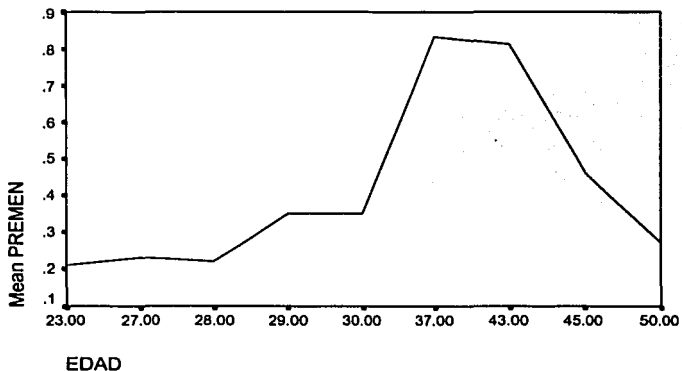


Fig.1 Relación del promedio de actividad de la enzima sulfatasa de esteroides con la edad de las mujeres premenopáusicas. Mean PREMEN; promedio de la actividad de la enzima expresado en pmol/mg/prot/hr, EDAD, edad de las pacientes premenopáusicas.

### Relación edad de posmenopáusicas y actividad de la SE

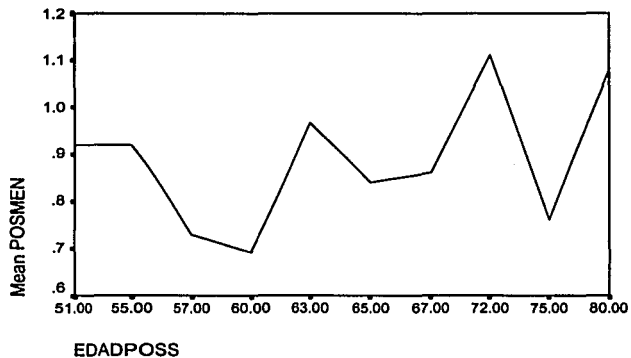


Fig.2 Relación del promedio de actividad de la enzima sulfatasa de esteroides, expresado en pmoI/mg/proI/hr con la edad de las mujeres posmenopáusicas. Mean POSMEN; promedio de la actividad de la enzima expresado en pmoI/mg/proI/hr, EDADPOSS, edad en años de las pacientes premenopáusicas.

### Media de la actividad de la enzima, con relación a la edad en años de ambos grupos de pacientes.

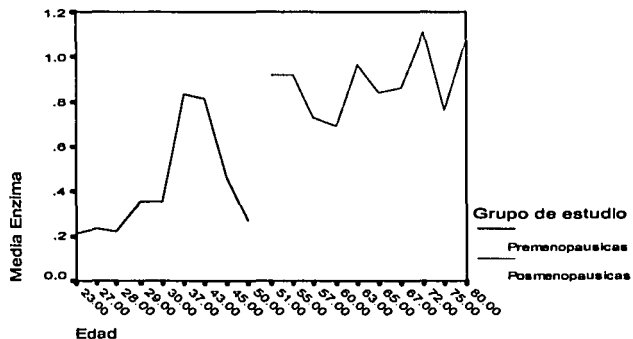


Fig.3 Gráfico comparativo, de las curvas de actividad de la enzima sulfatasa de esteroides en leucocitos de mujeres pre (Rojo) y posmenopáusicas (Verde). Media ENZIMA, actividad de la enzima expresada en pmoI/mg/proI/hr. Edad; edad en años de las pacientes estudiadas.

## DISCUSIÓN

La enzima SE también conocida como arilsulfatasa C (ASC) o esteril-sulfato sulfhidrolasa (EC 3.1.6.2) es una de las 6 arilsulfatasas identificadas en los tejidos humanos (A, B, C, D, E y F). Se localiza en el retículo endoplásmico rugoso, unida a la membrana microsomal, en la cisterna de Golgi, estructuras endocíticas y sobre todo en los microsomas (8,24).

Esta sulfatasa está compuesta por 583 residuos de aminoácidos, los primeros 22 corresponden al péptido líder el cual es escindido postranscripcionalmente para dar origen a la proteína madura. El primer aminoácido (aa) de esta proteína corresponde a una metionina y los residuos serina<sup>21</sup>, histidina<sup>22</sup> o bien alanina<sup>23</sup> y alanina<sup>24</sup> representan las señales de reconocimiento de la peptidasa encargada de escindir la señal líder. Este proceso dura aproximadamente dos días y la vida media de esta enzima se ha estimado en 4 días (8,9).

La SE tiene un peso molecular de 65,492 Da, muestra una distribución ubicua y se ha detectado en vagina, endometrio, ovario, próstata con hipertrofia benigna y células cancerosas de mama. Su pH óptimo oscila entre 6.5-7.5, su Km es de 0.8 $\mu$ M para el sulfato de estrona, de 1.7 $\mu$ M para el sulfato de dehidroepiandrosteona y de 0.6 $\mu$ M para el sulfato de testosterona. La función de esta arilsulfatasa es catalizar la hidrólisis del radical sulfato de sus substratos, los 3-beta-hidroxiesteroideos sulfatados (i.e. sulfatos de colesterol, estrona, testosterona, pregnenolona y dehidroepiandrosterona) (9).

La actividad de la SE puede ser determinada prácticamente en cualquier tejido y en cualquier línea celular. Diversos estudios han mostrado que existen diferencias en la actividad enzimática en los diferentes tejidos, incluso se han detectado diferencias entre ambos sexos. Se ha reportado también diferencia en la actividad en estados como la pre pubertad y la pubertad. En este sentido, aparentemente los varones y mujeres pre púberes muestran una actividad enzimática mayor, en comparación con los púberes, encontrándose una proporción de 2:1. Estas diferencias en la actividad sugieren una posible influencia hormonal sobre la actividad de la enzima (22,23).

Por otra parte, en los últimos años, la participación de las hormonas esteroideas y sus receptores, particularmente estrógenos y andrógenos y la relación que guardan con el metabolismo y fenotipo óseo, ha sido motivo de múltiples investigaciones. Algunos de estos trabajos han demostrado que los estrógenos participan en los procesos de formación y remodelación ósea. Aparentemente, algunos de sus mecanismos de acción más importantes se relacionan con la supervivencia de los osteoblastos a través de la acción mediada por citocinas y otros factores de crecimiento principalmente. Se sabe incluso que acciones estrogénicas en tejidos diferentes al hueso repercuten sobre el fenotipo óseo (3-5). Es posible que la reducción posmenopáusica en la actividad de las enzimas relacionadas con la producción ósea de estrógenos podría guardar relación con los procesos fisiopatológicos de la osteoporosis. Una de las enzimas que participa de manera normal en el metabolismo de hormonas esteroideas es la sulfatasa de esteroides (SE).

En el presente estudio se evaluó y comparó la actividad de la SE en dos grupos de mujeres (pre y postmenopáusicas), como se describe en los resultados se encontró una



diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Esto sugiere que la edad y como consecuencia el estado hormonal, guardan relación con los niveles de actividad de las diferentes enzimas implicadas en el metabolismo de hormonas esteroideas.

Es importante señalar, que a pesar de que la actividad enzimática fue investigada en leucocitos, es posible que la actividad muestre diferencias en otras líneas celulares. Esto está dado entre otras cosas por las necesidades de la enzima en cada tejido. Es importante señalar que en este trabajo la actividad se determinó empleando como sustrato el sulfato de dehidroepiandrosterona y consideramos que si la actividad en estos mismos grupos de pacientes (pre y postmenopáusicas) es determinada con sustratos como el sulfato de estrona, las diferencias pueden ser aún más significativas.

El haber demostrado la diferencia de actividad enzimática en leucocitos de pre y postmenopáusicas nos permitió por una parte mostrar nuevamente que la actividad de la enzima se ve modificada por diversas condiciones hormonales. Por otra parte, nos ha dado la pauta para plantear la dirección de nuevas investigaciones, en nuestro caso, encaminadas a explorar lo que ocurre con la actividad de esta enzima durante el metabolismo óseo normal y en estados de degradación ósea (i.e. osteoporosis).

**REFERENCIAS**

1. Marcus R. New perspectives on the skeletal role of strogen. *Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83:7:2236-38.
2. Cooper MS/ Waiker EA, Bland R/ Fraser WD, Hewison M and Stewart PM. Expression and Functional Consequences of 11 (3-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone. *Bone* 2000; 27 (3):375-81.
3. Janssen JM/ Bland R, Hewison M, Coughtrie MW, Sharp S, Pols HA/ van Leeuwen JP. Estradiol formation by human osteoblasts via múltiple pathways: relation with osteoblast function. *J Cell Biochem* 1999; 1 :75(3):528-37.
4. Hiroshi F, Fumiya O/ Yuzuru K, Akihito S, Hiroshi Ch, Kazuhisa SH/ Hiroshi S and Tamuki Y. Steroid sulfatase activity in osteoblast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 231:42-47.
5. Purohit A, Flanagan AM, Reed MJ. Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *Endocrinology* 1992;131: 2027-2029.
6. Saito H, Yanaihara T. Steroid formation in osteoblast-like cells. *J Int Med Res* 1998; 26 (1): 1-12

7. Fujikawa H, Okura F, Kuwano Y, Sekizawa A, Chiba H, Shimodaira K, Sato H, Yanaihara T. Steroid sulfatase activity in osteoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231 (1): 42-7.
8. Hobkirk R. Steroid sulfotransferases and steroid sulfate sulfatases: characteristics and biological role. *Can J Biochem Cell Biol* 1985; 63: 1127.
9. Dibbelt L, Kuss E. Human placental steryl sulfatase: Interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition-state analogues, amino-acid modifiers and anion transport inhibitors. *Biol Chem Hoppe-eyler* 1991; 372: 173.
10. Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* 1997; 5:277-289.
11. Stein C, Hille A, Seidel J, Rijnbout S, Waheed A, Schmidt B, Geuze H, von Figura K. Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosilation and subcellular distribution in BHK-21 cells. *J Biol Chem* 1989; 264 (23): 13865-72.
12. Compagnone NA, Salido E, Shapiro L and Mellon S. Expression of Steroid Sulfatase during embryogenesis. *Endocrinology* 1997;138:11:4768-73.

13. Li PK, Rhodes ME, Burke AM and Johnson DA. Memory enhancement mediated by the steroid sulfatase inhibitor (p-O-sulfamoyl)-N tetradecanoyl tyramine. *Life Sci* 1997; 60:L45-L51.
14. Yanaihara A, Yanaihara T, Toma Y, Shimizu y, Saito H, Okai T, Hagashiyama T and Osawa Y. Localization and expression of steroid sulfatase in human fallopian tubes. *Steroids* 2001; Jan 1, 66(2): 87-91.
15. Valigora SD, Lib PK, Dunphi G, Turner M and Eli DL. Steroid sulfatase inhibitor alters blood pressure and steroid profiles in hypertensive rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000, Jun; 73 (3-4): 113-22.
16. Muller C, Walhstrom J, Rogers H. Further evidence for assignment of steroid sulfatase X-linked ichthyosis locus to the telomere of Xp. *Hum Genet* 1981; 58: 446.
17. 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.
18. Fraser N, Ballabio A, Zollo M, Persico MG, Craig I. Identification of incomplete sequences steroid sulphatase on the human Y chromosome:

- evidence for an ancestral pseudoautosomal gene?. *Development* 1987; 101:127.
19. Sievert, Lynnette Leidy PhD 1. Freedman, Robert R. PhD 2. Garcia, Jesus Zarain MD 3. Foster, Jennifer W. MPH, CNM 1. Soriano, Ma. del Carmen Romano 4. Longcope, Christopher MD 5. Franz, Charlene 5. Measurement of hot flashes by sternal skin conductance and subjective hot flash report in Puebla, Mexico. *Menopause*. 9(5):367-376, September 2002.
  20. Spa: [inverted question mark]Sirven los remedios naturales para aliviar los sintomas de la menopausia? *Pan American Journal of Public Health*. 9(5):322, May 2001.
  21. Spa: Factores que influyen en la edad de la menopausia. *Pan American Journal of Public Health*. 5(2):123, February 1999.
  22. Miyakawa Y, Kawano Y, Taniyama K, Mori N. Steroid sulfatase activity in human leukocytes. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 38 (3):191-3.
  23. Cuevas SA, Juarez MA, Miranda R, Diaz JC. Comparative analysis of human steroid sulfatase activity in prepubertal and postpubertal males and females. *Biochem Mol Biol Inter* 1993; 30:691-94.
  24. Monroe DG and Chang PL. Tissue-specific expresion of human arylsulfatase-C isozymes and steroid sulfatase. *Am J Hum Genet* 1987, 40: 102-114.