

El ensayo enzimático de la sulfatasa esteroidea en la ictiosis ligada al X

Sergio A. Cuevas-Covarrubias, Marco A. Juárez-Oropeza, Rodrigo Miranda-Zamora, Juan C. Díaz-Zagoya
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

(Recibido , diciembre 11, 1991; aceptado, marzo 16, 1992)

Resumen

La determinación de la actividad de la sulfatasa de esteroides en leucocitos humanos permite el diagnóstico de la ictiosis recesiva ligada al cromosoma X (RXLI) utilizando como sustrato al sulfato de dehidroepiandrosterona. En el presente trabajo, se consideraron diferentes variables para determinar las condiciones óptimas del ensayo enzimático en pacientes con RXLI, portadoras y controles normales. Encontramos que la actividad no se modifica con el ayuno, presencia de detergentes (SDS) o cuando la muestra se conserva por varias horas a temperatura ambiente. Por otro lado, el mantener el homogenado a -4°C durante 24 h disminuye la actividad en un 50%. El valor del pH para el ensayo puede estar entre 6.5 y 7.0. El tiempo necesario para el ensayo diagnóstico de los pacientes con RXLI puede ser de 1 a 2 h.

Claves: Sulfatasa esteroidea Ictiosis Leucocitos

Summary

Evaluation of steroid sulfatase (STS) activity in human fibroblasts or leukocytes can be used to diagnose recessive X-linked ichthyosis (RXLI), using cholesterol sulfate or dehydroepiandrosterone sulfate as substrates. In this study, we analyzed the STS activity in mononucleated white cells to determine the best condition for the assay. The enzyme activity was not modified by fasting, SDS, or storage of the samples at room temperature. A decrease in the enzyme activity was observed in samples stored at temperature lower than -4°C . The assay can be done from pH 6.5 to 7.0. A suitable incubation time for the assay to reach diagnostic results was from one to two hours. The procedure was tested in RXLI patients, carrier women, as well as in normal controls.

Key words: Steroid sulfatase Ichthyosis Leukocytes

Introducción

La identificación inicial de la ictiosis recesiva ligada al X (RXLI) corresponde a Kerr y cols.¹, quienes en 1965, al estudiar sus manifestaciones clínicas y árbol genealógico, la identificaron como una entidad diferente de las demás ictiosis. La RXLI es una genodermatosis caracterizada por engrosamiento del estrato córneo que presenta, clínicamente, una descamación anormal. Se manifiesta en los primeros años de vida con aparición de escamas generalizadas y oscuras, con predominio en pabellones auriculares, cuello, zonas de flexión, cara anterior de abdomen, plantas de los pies y, ocasionalmente, en espalda¹. En algunos casos se asocia hipogonadismo, criptorquidia, anosmia, retardo mental y epilepsia^{2,3}. Se ha

observado también la presencia de opacidades corneales⁴. Tiene una frecuencia de 1 en cada 6,000 hombres y cursa con buen pronóstico para la vida, implicando únicamente el aspecto estético para el paciente¹. En 1978, Shapiro y cols.^{5,6} encontraron en el cultivo de fibroblastos de piel de pacientes con RXLI una deficiencia de la actividad de la sulfatasa esteroidea (STS) (E.C.3.1.6.2). La STS es una de las tres arilsulfatasas de los tejidos humanos (A, B y C). Las formas A y B son lisosomales, actúan a pH ácido y sus sustratos naturales son los sulfátidos de cerebrósidos y el sulfato de dermatán, respectivamente⁷. La arilsulfatasa C se encuentra unida a la membrana microsomal y tiene como sustratos a

los sulfatos de colesterol, estrona y dehidroepiandrosterona⁸. Su acción, como su nombre lo indica, consiste en desulfatar hidrolizando sus substratos para que éstos puedan entrar a sus vías metabólicas. A pesar de actuar sobre tres substratos, únicamente el sulfato de colesterol se acumula en los pacientes que presentan esta deficiencia enzimática. El gen que codifica para la STS se ubica en el brazo corto del cromosoma X en la región Xp22.3⁹. El 80-90% de los pacientes con RXLI presentan deficiencia de la enzima a causa de deleciones completas de este gen¹⁰.

El diagnóstico de la RXLI se ha establecido considerando la deficiencia enzimática de la STS. Otra serie de estudios señala que el diagnóstico es posible utilizando la movilidad electroforética de las lipoproteínas de baja densidad, las cuales presentan una mayor migración en los pacientes con RXLI¹¹. De igual forma, se han tratado de correlacionar, con base en el ensayo enzimático, las manifestaciones clínicas más constantes en este padecimiento que permitan diferenciarlo de las demás ictiosis¹². El diagnóstico de la RXLI se ha realizado, de una manera más sencilla, empleando la determinación de la STS en leucocitos¹³. En el presente trabajo, utilizando la población de leucocitos mononucleares, primero de sujetos sanos, hemos considerado las características del ensayo enzimático y los factores que pueden influir en su determinación para establecer las condiciones óptimas de la prueba. Luego se ha aplicado el ensayo a pacientes con RXLI, a portadoras y a sujetos sanos de ambos sexos y diferentes edades.

Material y métodos

Para conocer las condiciones óptimas del ensayo enzimático, éste se realizó en leucocitos¹³ obtenidos de muestras de sangre de voluntarios sanos, bajo conocimiento de causa. La sangre se obtuvo con los voluntarios en ayunas, excepto para el estudio de la variable ayuno, con jeringa estéril, heparinizada (10 U por ml de sangre, aproximadamente). Se diluyó con un volumen de solución de NaCl 0.9% y se procedió a la separación de mononucleares según el procedimiento de Ting y Morris¹⁴. Descrito brevemente: se adicionó 0.25 volúmenes de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077) a la muestra de sangre diluida, cuidando que el Ficoll-Hypaque ocupara únicamente la porción inferior, y se centrifugó a 400 g por 20 min. El anillo de mononucleares se recuperó y se lavó en una ocasión. Para lisar los eritrocitos residuales, se adicionó 2 ml de cloruro de amonio 0.85% por 10 min. Nuevamente, se

lavó el paquete en 3 ocasiones con solución fisiológica. Para el ensayo enzimático se utilizó el paquete de mononucleares así obtenido, modificando los métodos de Epstein¹³ y Burstein¹⁵. El paquete se homogenizó en buffer-tris 0.014 M helado (el rango de pH fue de 6.4 a 8.0), utilizando un polytron con vástago del número 10, con 2 ciclos a la máxima velocidad, el primero de 20 seg y el segundo de 10. Para el ensayo (volumen final 160 μ l) se utilizaron 150 μ l del homogenado y se aplicó, en un volumen de 10 μ l, sulfato de dehidroepiandrosterona -7 ³H (DHEAS-7 ³H New England Nuclear, Boston Mass.) como sustrato para la determinación de la actividad enzimática en diversas condiciones de pH (6.4-8.0), concentración del sustrato (16-58 nM) y tiempo (1-4 h). Para detener la reacción se aplicó 1 ml de benceno frío (Merck, grado analítico).

Para la determinación del producto obtenido, se tomó de la fase orgánica una alícuota de 600 μ l, a la que se le adicionó 5 ml de líquido de centelleo y se leyó en un contador Packard Tri-Carb modelo 3255. Para referencia de la actividad enzimática se determinaron proteínas por el método de Bradford¹⁶. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado incluyéndose también un blanco.

Cuando se determinaron las condiciones óptimas del ensayo enzimático, se procedió a estudiar a una familia

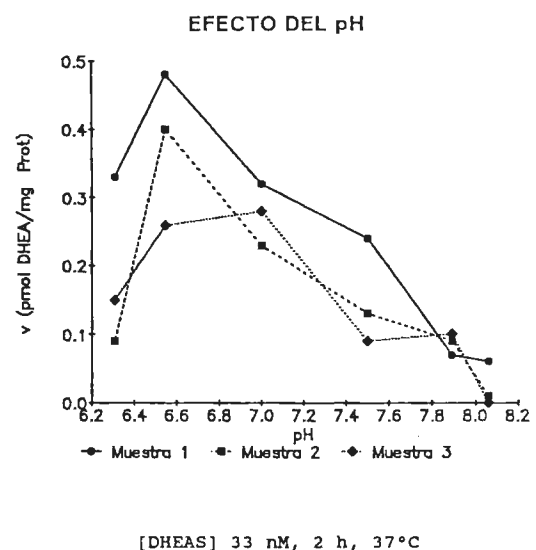


Fig. 1. Efecto del pH sobre la actividad de la STS en leucocitos de sujetos normales. Cada una de las pruebas se hizo por duplicado, incluyéndose un blanco sin enzima. Muestras 1, 2 y 3 corresponden a muestras independientes de sujetos masculinos de 20 años de edad.

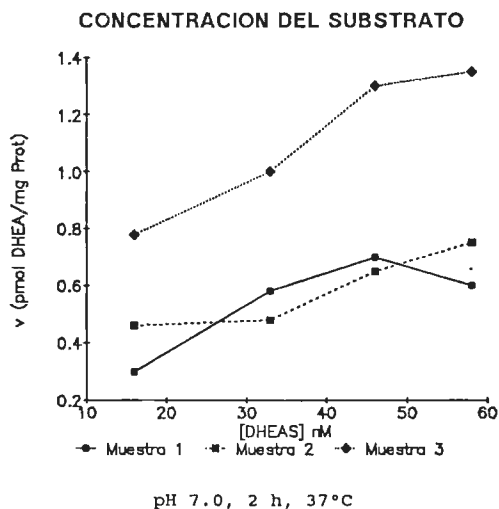


Fig. 2. Efecto de la concentración del sustrato (DHEAS-7 ³H), sobre la velocidad de la STS en leucocitos de sujetos normales. La actividad específica del sustrato es de 16,000 cpm/pmol. Muestras 1, 2 y 3 corresponden a muestras independientes de sujetos masculinos de 20 años.

que acudió al servicio de Genética del Hospital General de México SSA con diagnóstico probable de RXLI por clínica y árbol genealógico. Todos los

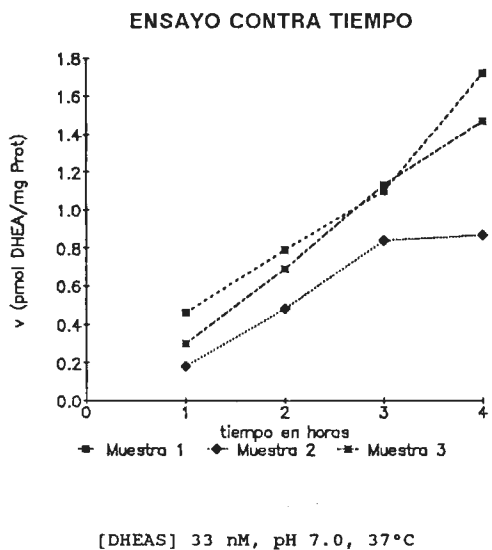


Fig. 3. Velocidad de la reacción catalizada por la STS en relación al tiempo de incubación, en leucocitos de sujetos normales. Se ensayó de 1 h a 4 h como tiempo de incubación. Las muestras 1, 2 y 3 corresponden a muestras independientes de sujetos masculinos de 20 años.

pacientes presentaron la aparición de la sintomatología al primer año de vida, consistente en escamas generalizadas oscuras de predominio en abdomen, espalda y extremidades superiores. El caso más afectado fue el individuo de 74 años y el de 19 era

Actividad Enzimática de Individuos Sanos en Diferentes Condiciones (pmol/mg prot)

	Media ± DE
Ayuno	0.89 ± 0.23
No ayuno	0.75 ± 0.09
Inicial	1.23 ± 0.26
4h Después	1.17 ± 0.14
1 Día*	0.79 ± 0.12
2 Día*	0.43 ± 0.09
Sin SDS	2.83 ± 0.56
Con SDS	3.12 ± 0.59

Cuadro 1. Actividad enzimática en cada grupo dependiendo de la variable analizada. Cada muestra está pareada por edad y sexo. *Sólo cuando se mantuvo el homogenado a -4°C y se analizó al día siguiente se presentaron diferencias significativas (p < 0.001). La edad para el ayuno, SDS y 1 y 2 días fue entre 40 y 50 años. Para inicial y 4 h después fue entre 1 y 10 años, n=4. Todos estuvieron en ayunas excepto donde se indica.

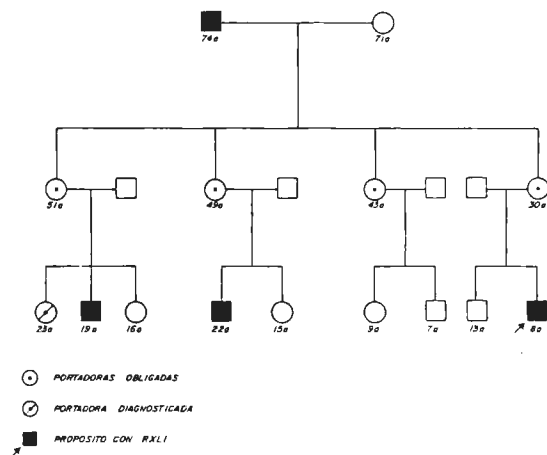


Fig. 4. Arbol genealógico de la familia con RXLI. El ensayo enzimático se realizó en los pacientes y en las portadoras obligadas, así como en las mujeres de la familia. Una de ellas presentó valores por debajo de los varones sanos, por lo que se identificó como portadora.

sordomudo. No se encontraron otras alteraciones.

El análisis estadístico se realizó con el paquete Epistat de IBM, con la prueba de Wilcoxon para grupos pareados y ANOVA con Duncan entre grupos. Se consideró un nivel de significancia de 0.05.

Resultados

Para conocer cuáles son las condiciones más apropiadas del ensayo de la STS, se consideró inicialmente el pH (Fig. 1). Las muestras se trabajaron

en buffer-tris 0.014 M, con valores de pH de 6.3 a 8.0. La actividad más alta está presente entre los valores de pH de 6.5 y 7.0, disminuyendo la actividad detectable en los valores de pH extremos. En la Fig. 2 se aprecia la velocidad de la reacción en relación a la concentración del sustrato. Se utilizó desde 16 hasta 58 nM (alrededor de 20,000 hasta 120,000 cpm), la actividad específica corresponde a 16,000 cpm/pmol. La actividad es lineal en los puntos analizados. Para determinar el tiempo adecuado de estimación de la actividad enzimática, se trabajó desde 1 h hasta 4h. En la Fig. 3 se aprecia también una reacción lineal en los tiempos ensayados. En el Cuadro 1 se observan las condiciones valoradas de ayuno, presencia del detergente SDS (10 mg/dl), almacenamiento de la muestra de sangre a temperatura ambiente por 4 h y cuando el homogenado fue analizado al día siguiente habiendo sido mantenido a -4°C . Exceptuando esta última condición, que presenta una diferencia significativa ($p < 0.001$), las demás condiciones no muestran diferencias ($p > 0.05$).

Cuando se identificaron las condiciones óptimas del ensayo, se analizó la familia con diagnóstico probable de RXLI. El árbol genealógico se aprecia en la Fig. 4.

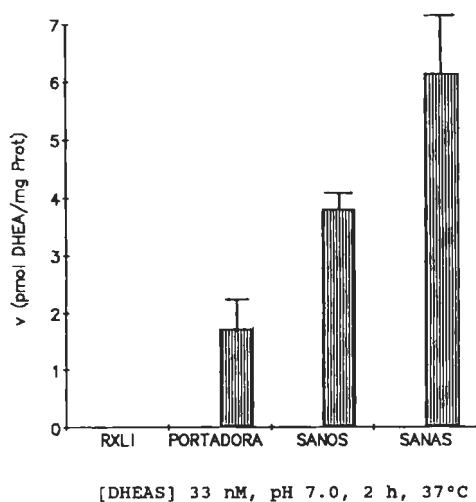


Fig. 5. Actividad enzimática de STS en una familia con 4 casos de RXLI. Los pacientes son de 8,19,22 y 74 años. El resto entre 30 y 50 años, $n=4$ en cada grupo. Se encontró una diferencia significativa entre todos los grupos ($p < 0.001$).

En la Fig. 5 se observan los valores encontrados en los pacientes y en las portadoras obligadas, así como en los controles sanos de la misma familia. Las edades de los sujetos estudiados fueron: los controles y

portadoras entre 30 y 50 años y los pacientes de 8, 19, 22 y 74 años.

Discusión

El ensayo de la actividad enzimática de la STS en leucocitos permite hacer un diagnóstico certero de la RXLI. Otros autores han valorado la actividad utilizando fibroblastos en cultivo^{5,6}, en los cuales se realiza el ensayo. Esta técnica resulta demasiado costosa y tardada. También se ha intentado hacer el diagnóstico mediante la movilidad electroforética de la LDL¹¹, o clínicamente¹². La manera más adecuada de hacerlo es determinando la actividad de la enzima. Actualmente, la población de leucocitos resulta fácil de obtener y presenta menos riesgo, tiempo y costo para su utilización en el ensayo enzimático¹³.

Considerando la utilización que se ha hecho actualmente de los leucocitos en la determinación enzimática, nosotros analizamos las variables que pudieran ser importantes en el ensayo de esta prueba. El pH ideal para el ensayo enzimático es de 6.5, donde la actividad de la enzima es más alta, sin embargo se tiene un buen margen entre los valores de 6.5 hasta 7.4, inclusive. Para considerar la cantidad de sustrato a utilizar, se debe tener en cuenta que se trata de compuestos marcados y, por lo tanto, lo más adecuado es trabajar con la menor cantidad posible, de esta manera el costo y riesgo disminuyen. En el presente estudio consideramos que una concentración 33 nM de DHEAS-7 ^3H (80,000 cpm, aproximadamente) es una cantidad adecuada a seleccionar. El tiempo de ensayo puede establecerse desde la primera hora hasta las 4 horas siguientes. Aquí, es conveniente considerar que lo mejor es adoptar el menor tiempo posible que nos permita hacer el diagnóstico inclusive de las portadoras. Con base en esto, creemos que el ensayo a 2 h nos permite identificar con claridad a este grupo. El efecto del ayuno no es importante para llevar a cabo el análisis, ya que cuando se realizó bajo ambas condiciones no hubo diferencias significativas. De igual manera, ni la presencia del detergente SDS ni el mantener la muestra a temperatura ambiente por 4 h afectan la actividad enzimática. Estas características nos ofrecen una mayor seguridad en el manejo de la muestra y un margen en cuanto a las condiciones en las que debe realizarse el estudio. Sólo cuando se mantiene el homogenado para ser analizado al día siguiente, las condiciones del ensayo varían de manera importante. Aun bajo esta condición el ensayo puede llevarse a cabo para la detección de los pacientes con RXLI, como se muestra en la Fig. 5, ya que éstos no

presentan actividad detectable de la enzima. Sin embargo, se debe tener precaución si lo que se quiere es hacer el diagnóstico de portadoras, ya que éstas presentan una actividad menor que los controles sanos. Considerando esto, la actividad enzimática encontrada en las mujeres es mayor que en los varones sanos. Esto podemos explicarlo al considerar que el gen que codifica para la STS es de los pocos genes que se mantiene activo en el cromosoma X inactivo (inactivación del cromosoma X)¹⁷. Sin embargo, a pesar de tener una doble dosis de este gen, los valores de la actividad enzimática encontrados en la mujer no alcanzan el doble, por lo que es muy probable que existan otros mecanismos regulando su expresión. Cabe mencionar que las portadoras presentaron niveles más bajos incluso que los varones sanos, siendo de esperarse una actividad similar en ambos, puesto

que la dosis genica es igual en los dos. Es conveniente utilizar controles sanos, hombres y mujeres, que nos permitan diferenciar de manera adecuada a las portadoras. Por otro lado, los valores encontrados de la actividad de la STS son muy semejantes a los reportados por Shapiro en fibroblastos^{5,6}; sin embargo, presentan una diferencia muy notable en comparación a los que refiere Okano¹² en leucocitos. Es probable que esto se deba a factores étnicos.

Por último, como se mencionó anteriormente, el defecto de esta enzima produce la acumulación del sulfato de colesterol, principalmente en piel, donde se observan las manifestaciones clínicas en estos pacientes. Esto representa un padecimiento en el cual la acumulación del substrato de la enzima es la causa de la sintomatología, sin encontrarse repercusión por la deficiencia de su producto.

Referencias

- 1 Kerr CB, Wells RS. Sex linked ichthyoses. *Ann Hum Genet* 1965;29:33-50.
- 2 Unamuno P, Martin C, Fernandez E. X-linked ichthyoses and cryptorchidism. *Dermatologica* 1986;172:326-9.
- 3 Perrin JC, Idemoto JY, Sotos JF, Maurer WF, Steinberg AG. X-linked syndrome of congenital ichthyosis, hypogonadism, mental retardation and anosmia. *Birth Defects* 1976; 12 (5): 276-84.
- 4 Sever RJ, Frost P, Weinstein G. Eye changes in ichthyosis. *JAMA* 1968; 206:2283-6.
- 5 Shapiro LJ, Weiss R. X-linked ichthyosis due to steroid sulphatase deficiency. *Lancet* 1978;14:70-2.
- 6 Shapiro LJ, Roberta W, Buxman M, Vidgoff J, Diamond RL. Enzymatic basis of typical X-linked ichthyosis. *Lancet* 1978;7:7567.
- 7 Baum H, Dogson KS, Spencer B. The assay of arylsulfatase A and B in human urine. *Clin Chim Acta* 1959;4:453-5.
- 8 Dolly JO, Dodgson KS, Rose FA. Studies on the oestrogen sulphatase and arylsulphatase C activities of rat liver. *Biochem J* 1972;128:337-45.
- 9 Muller C, Walhstrom J, Roger H. Further evidence for the assignment of steroid sulfatase X-linked ichthyosis locus to the telomere of Xp. *Hum Genet* 1981;58:446.
- 10 Bonifas JM, Morley BJ, Oakey RE, Waikon Y, Epstein EH. Cloning of cDNA for steroid sulfatase: frequent occurrence of gene deletions in patients with recessive X-chromosome-linked ichthyosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9248-51.
- 11 Epstein EH, Krauss RM, Shackleton CH. X-linked ichthyosis: increased blood cholesterol sulfate and electrophoretic mobility of low-density lipoprotein. *Science* 1981;214 (6):659-60.
- 12 Okano M, Kitano Y, Yoshikawa K, Nakamura T, Matsuzawa Y, Yuasa T. X-linked ichthyosis and ichthyosis vulgaris: comparison of their clinical features based on biochemical analysis. *Brit J Dermatol* 1988; 119:777-83.
- 13 Epstein EH, Leventhal ME. Steroid sulfatase of human leukocytes and epidermal and the diagnosis of recessive x-linked ichthyosis. *J Clin Invest* 1981;67:1257-62.
- 14 Ting A, Morris PJ. A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood. *Vox Sang* 1971;20:561-3.
- 15 Burstein S, Dorfman RI. Determination of mammalian steroid sulfatase with 7 alpha-h-beta-hydroxyandrost-5-en-17-one sulfate. *J Biol Chem* 1963;238(5):1656-60.
- 16 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- 17 Gartler S. Mammalian X-chromosome inactivation. *Ann Rev Genet* 1983;17:155-90.