

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças de natureza genética provocadas por um defeito enzimático, que conduz ao bloqueio de uma determinada via metabólica. Como consequência do bloqueio, há acumulação do substrato da reacção deficitária, com diminuição da síntese do produto da reacção ou desvio do substrato para uma via metabólica alternativa (Amâncio *et al.*, 2007). Ocasionalmente, portanto, falha na síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo e afectam as capacidades do organismo de produção de energia (Husny e Fernandes-Caldato, 2006; Pasquali *et al.*, 2006).

Os EIM são a causa das doenças hereditárias do metabolismo (DHM) nas quais a ausência de um produto esperado, a acumulação do substrato ou a utilização de uma rota metabólica alternativa, pode levar ao comprometimento dos processos celulares (Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

Os EIM representam cerca de 10% de todas as doenças genéticas. A incidência isolada de cada uma das doenças metabólicas é pequena. No entanto, embora, individualmente raros, os cerca de 500 distúrbios conhecidos têm uma incidência estimada, no seu conjunto, de 1:1.000 recém-nascidos vivos (Amâncio *et al.*, 2007; Araújo, 2004), havendo também alguns estudos que referem uma incidência de 1/5.000 recém-nascidos vivos (Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

As DHM são, na sua grande maioria, de transmissão autossómica recessiva, ou seja, têm um risco de recorrência de 25 % a cada gestação se os pais forem heterozigóticos. Algumas destas doenças são de hereditariedade ligada ao cromossoma X, isto é, a mãe é portadora da mutação, sendo o risco de recorrência nestes casos de 50 % a cada gestação para o sexo masculino (Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

O reconhecimento clínico precoce de EIM reduz a taxa de morbilidade e mortalidade (Raghuveer *et al.*, 2006).

1.1.1. História

O termo “erros inatos de metabolismo” foi introduzido por Archibald E. Garrod durante primeira década do século XX, mais concretamente em 1908. Formulou a hipótese de que a herança autossómica recessiva, de acordo com as leis de Mendel sobre a hereditariedade, explicaria a ocorrência de alcaptonúria, entre outros EIM. Em 1908, publicou o livro “Inborn Errors of Metabolism” (“Erros Inatos de Metabolismo”), no qual descrevia além da alcaptonúria, outras doenças metabólicas, nomeadamente a porfiria, a pentosúria e cistinúria (Husny e Fernandes-Caldato, 2006; Baric *et al.*, 2001).

Em 1941, Beadle e colaboradores consideraram que todos os processos bioquímicos do organismo ocorrem sob controlo genético e, portanto, mutações nos genes provocariam vias bioquímicas deficientes (Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

Desde a segunda edição do livro Erros Inatos do Metabolismo, em 1923, onde se incluíam apenas seis doenças hereditárias do metabolismo, até a 1950, o avanço no conhecimento sobre estes distúrbios foi lento. A partir dessa década, a evolução da ciência, o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais e a tecnologia do DNA levou a que se admita hoje, a existência de mais de 500 DHM, às quais se juntam progressivamente novas, à medida que são descobertas (Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

1.1.2. Classificação

Uma vez que há alterações metabólicas bastante distintas, há também diversas classificações dos EIM. No entanto, a estabelecida por Saudubray e Charpentier (1995) é das mais utilizadas por ter uma apresentação didáctica e aplicação clínica.

De acordo com essa classificação, os EIM dividem-se em duas categorias:

- ✓ **Categoria 1:** engloba as alterações que afectam um único sistema orgânico ou órgão, como o sistema imunológico, os factores de coagulação, os túbulos renais ou os eritrócitos;
- ✓ **Categoria 2:** abrange um grupo vasto de doenças cujo defeito bioquímico compromete uma via metabólica comum a diversos órgãos, como as doenças lisossomais, ou apesar de restrito a um só órgão, tem manifestações sistémicas (como por exemplo a hiperamonémia nos defeitos do ciclo da ureia).

As doenças da Categoria 2 apresentam enorme diversidade clínica e acarretam grande dificuldade diagnóstica, diferenciando-se, ainda, neste aspecto das doenças da Categoria 1, nas quais os sintomas são uniformes e, portanto, o diagnóstico é facilitado. Dada a grande variabilidade de alterações que compõem a **Categoria 2**, as DHM são divididas em três grupos conforme as características fisiopatológicas e fenótipo clínico (Husny e Fernandes-Caldato, 2006):

- **Grupo I:** EIM intermediário que culminam em intoxicação aguda ou crónica;
- **Grupo II:** EIM intermediário que afectam a produção ou utilização de energia;
- **Grupo III:** EIM que afectam a síntese ou catabolismo de moléculas complexas.

O **grupo I** inclui os erros inatos do metabolismo intermediário que provocam intoxicação aguda ou crónica, por acumulação de compostos tóxicos próximos do bloqueio metabólico. Exemplos deste grupo são: os defeitos no catabolismo dos aminoácidos, acidúrias orgânicas, intolerância à frutose, porfiria, défices do ciclo da ureia e intoxicação por metais.

Todos os défices deste grupo partilham a mesma expressão clínica: não interferem com o desenvolvimento embrionário, a sua expressão clínica pode ser aguda, crónica ou sistémica ou envolver só um órgão específico (Saudubray *et al.*, 2006). É caracterizada por intervalos livres de sintomatologia e por sinais clínicos típicos de intoxicação aguda (vómitos, letargia, acidose metabólica, desidratação, coma, disfunção hepática, etc.) ou crónica (atraso do desenvolvimento neuro-psico-motor (DNPM), luxação de cristalino), devido à acumulação de compostos tóxicos, decorrentes do bloqueio metabólico e, por terem uma relação com a ingestão alimentar (Husny e Fernandes-Caldato, 2006). A sintomatologia pode iniciar-se no período neonatal, na infância ou na fase adulta, de forma contínua ou intermitente (Saudubray *et al.*, 2002).

A maioria destas doenças é tratável. O tratamento requer a remoção da toxina do organismo, através de dietas especiais, procedimentos extra-corporais, ou mediante administração de drogas. A terapia nutricional é importante no tratamento deste grupo de DHM, pois, para além de remover o substrato tóxico, pode também, repor o produto metabólico que está em défice (Saudubray *et al.*, 2006).

Embora a fisiopatologia seja diferente, os erros inatos da síntese e catabolismo de neurotransmissores (monoaminas, GABA e glicina) tal como, os da síntese de aminoácidos (serina, glutamina, e prolina/ornitina) podem também ser incluídos neste grupo desde que

partilhem as mesmas características: são EIM intermediário, o seu diagnóstico é confirmado por análises no plasma, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR) (Saudubray *et al.*, 2006).

O **grupo II** inclui EIM intermediário que afectam os processos enérgicos do citoplasma e mitocôndria, com sintomas provocados por uma deficiência na produção ou utilização de energia, devido a distúrbios no fígado, miocárdio, músculo, cérebro ou outros tecidos (Saudubray *et al.*, 2002).

Os defeitos na mitocôndria são os mais graves e incluem doenças das vias metabólicas: (1) da cadeia respiratória, (2) ciclo de Krebs e (3) oxidação do piruvato (todas sem tratamento), (4) da oxidação dos ácidos gordos e (5) corpos cetónicos. Os defeitos no citoplasma são menos nocivos e incluem (1) defeitos na glicólise, (2) metabolismo do glicogénio, (3) gluconeogénese, (4) hiperinsulinismo, (5) via metabólica das pentoses fosfato e (6) da creatina. Algumas das doenças da mitocôndria e defeitos na via das pentoses fosfato, podem interferir com o desenvolvimento embrionário e provocar dismorfismos, displasia e malformações (Saudubray *et al.*, 2006).

Os sintomas mais comuns deste grupo são: atraso no crescimento, hipoglicémia grave, hiperlactacidémia, hipotonia generalizada, surdez neurosensorial, miopatia, cardiomiopatia, atraso do crescimento, arritmias, insuficiência cardíaca, defeitos de condução, colapso circulatório, síndrome de morte súbita infantil, dismorfia e malformações (Saudubray *et al.*, 2002; Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

O **grupo III** envolve EIM que afectam os organelos celulares e inclui doenças que perturbam a síntese ou o catabolismo de moléculas complexas. Desta forma, este grupo abrange (1) doenças nos lisossomas (doença de Gaucher e Fabry, entre outras) e (2) doenças dos peroxissomas, defeitos no (3) tráfico intracelular, na (4) glicosilação e na (5) síntese de colesterol (Saudubray *et al.*, 2006). Os sintomas são permanentes, progressivos, independentes de eventos intercorrentes e sem correlação com a ingestão alimentar (Husny e Fernandes-Caldato, 2006; Saudubray *et al.*, 2006).

Durante muitos anos todos estes EIM não tinham tratamento efectivo, no entanto, actualmente, algumas das doenças dos lisossomas, podem ser tratadas eficazmente por substituição enzimática ou por terapias que reduzam o substrato. Também em alguns dos défices da via de biossíntese de colesterol, o tratamento por suplementação oral de colesterol

juntamente com o uso de alguns inibidores enzimáticos pode diminuir a severidade clínica (Saudubray *et al.*, 2002).

1.1.3. Manifestações Clínicas

Os EIM podem induzir várias manifestações clínicas em múltiplos órgãos, em qualquer idade, começando *in útero*, passando pelo período neonatal e prolongando-se ao longo do primeiro ano de vida, como podem só vir a manifestar-se na adolescência ou mesmo na idade adulta (Raghuveer *et al.*, 2006). Algumas semanas após o nascimento, um bebé aparentemente saudável, pode começar a exibir alguns sinais clínicos característicos de DHM, os quais dependem do tipo de DHM e de múltiplos factores como: a exposição a um agente desencadeante, intercorrências infecciosas, sobrecarga proteica, stress metabólico, etc. Em resumo, aparecem quando há alteração, por factores exógenos, do equilíbrio bioquímico mantido até o momento pela criança (Raghuveer *et al.*, 2006; Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

As diversas manifestações clínicas podem estar associadas a disfunções no sistema nervoso central (SNC), rins, fígado, olhos, ossos, sangue, músculo e tracto gastrointestinal (Raghuveer *et al.*, 2006).

Os sinais clínicos sugestivos de DHM são apresentados na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Sinais clínicos sugestivos de DHM (adaptado de Saudubray *et al.*, 2002; Husny e Fernandes- Caldato, 2006; Raghuveer *et al.*, 2006; Saudubray *et al.*, 2006).

Manifestações Clínicas				
Bioquímica	Sistema Nervoso Central	Olhos e pele	Músculo, ossos e rins	Outros
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Acidose ou alcalose metabólica; ✓ Função hepática alterada (níveis elevados de transaminases ou hiperbilirubinémia); ✓ Aumento de proteínas no LCR; ✓ Cetose; ✓ Desequilíbrio hidroelectrolítico; ✓ Hipo ou hipertonia; ✓ Hipofosfatemia; ✓ Hipoglicémia ou hiperglicemia; ✓ Hipouricémia; ✓ Níveis elevados de amónia no plasma; 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agenesia do corpo caloso; ✓ Calcificações cerebrais; ✓ Deterioração neurológica; ✓ Desmielinização; ✓ Encefalopatia aguda; ✓ Encefalomielopatia sub-aguda; ✓ Macrocefalia ou microcefalia; ✓ Neuropatia periférica; 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alterações no cabelo (queda, alteração da textura); ✓ Atrofia óptica; ✓ Cataratas; ✓ Dermatose; ✓ Icterícia; ✓ Ictiose; ✓ Luxação ocular; ✓ Mácula vermelha; ✓ Mamilos invertidos; ✓ Opacidade da córnea; ✓ Retinopatia; ✓ Xantomas; 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Artroses; ✓ Câibras; ✓ Cardiomiopatia; ✓ Cálculo renal; ✓ Espasticidade muscular; ✓ Osteoporose; ✓ Pancreatite; ✓ Síndrome Fanconi; 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Apneia; ✓ Ataxia; ✓ Alterações no comportamento; ✓ Familiares falecidos precocemente, sem causa esclarecida; ✓ Coma; ✓ Consanguinidade; ✓ Convulsões; ✓ Diarreia; ✓ Atraso de crescimento; ✓ Diminuição do apetite; ✓ Dismorfias; ✓ Discrasias sanguíneas; ✓ Enfarte do miocárdio; ✓ Hepato e/ou esplenomegalia; ✓ Intolerância ao exercício; ✓ Irritabilidade; ✓ Letargia; ✓ Odor anormal da urina ou suor; ✓ Perda de capacidades adquiridas anteriormente: perda cognitiva e da expressão linguística, deficiências progressivas na atenção e concentração; ✓ Recusa alimentar; ✓ Atraso no desenvolvimento psico-motor; ✓ Taquipneia (provocada por acidose); ✓ Vômitos;

1.1.4. Diagnóstico e Tratamento

A classificação das DHM, tem sido extremamente útil, por auxiliar a visualizar os EIM como um todo, dirigindo o raciocínio diagnóstico para os grupos de doenças. De acordo com as características da doença ou sintomas, determina-se o grupo ao qual a doença pertence, de forma a delinear o caminho e os exames laboratoriais necessários que permitam um correcto diagnóstico (Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

Diagnosticar, rapidamente, é essencial para impedir o agravamento e a irreversibilidade dos sintomas. Nesse contexto, é de destacar o rastreio neonatal, uma vez que permite, com a detecção em fase pré-clínica, o reconhecimento e tratamento das DHM, prevenindo eventuais danos neurológicos ou mesmo a morte (Husny e Fernandes-Caldato, 2006). Tendo em conta que apenas poucas das DHM são diagnosticadas no *screening* neonatal, compete ao clínico estar atento para o conjunto de sintomas e sinais que indicam a necessidade de uma investigação direccionada para o diagnóstico atempado e consequente tratamento das DHM (Saudubray *et al.*, 2002).

O diagnóstico implica a realização de exames laboratoriais adequados, testes de urina, análises sanguíneas (sangue total, plasma, soro), análises no LCR, análises no líquido amniótico, determinação da actividade enzimática numa linha celular ou identificação do defeito molecular, entre outros (Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

No entanto, é de notar que o correcto diagnóstico para as DHM é por vezes dificultado pelo enorme número de doenças, pela sua complexidade, variedade de sintomas e serem consideradas, extremamente, raras (Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

1.2. Colesterol

1.2.1. Características químicas e biológicas

O colesterol é o principal esteroide dos tecidos humanos. A sua estrutura foi elucidada por Wieland e Dane em 1932 (Herman, 2003).

É um esteroide constituído por quatro anéis, ligados entre si e que no total formam uma molécula de 27 carbonos. A uma das extremidades do esteroide está ligada uma cadeia hidrocarbonada e na outra um grupo hidroxilo (Berg *et al.*, 2002). Consequentemente, tem carácter anfipático, pois possui uma cabeça polar (grupo hidroxilo em C3) e uma cadeia hidrocarbonada não polar (núcleo esteróide e cadeia lateral hidrocarbonada em C17). É um

composto com um núcleo ciclo-pentano-peridro-fenantreno, com uma ligação dupla em C5 (Nelson e Cox, 2005). A estrutura molecular do colesterol está ilustrada na Figura 1.1.

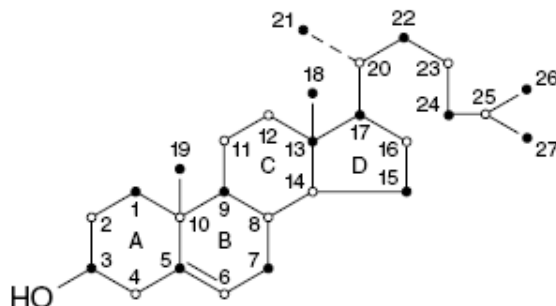


Figura 1.1. Estrutura da molécula de colesterol (retirado de Murray *et al.*, 2003).

O colesterol pode existir no organismo numa forma livre (forma principal na maioria dos tecidos), ou sob a forma de ésteres de colesterol, que resultam da esterificação da função álcool do colesterol por um ácido gordo de cadeia longa (Nelson e Cox, 2005).

Uma propriedade importante da maioria dos esteróis é a estabilidade do anel, com a exceção do precursor imediato do colesterol, o 7-deidrocolesterol (pró-vitamina D₃), que sofre uma alteração estrutural por meio da luz UV para sintetizar vitamina D₃. Todas as outras modificações nos esteróis deixam o sistema dos anéis intactos, embora tanto possam reduzir a hidrofobicidade, como podem aumentar o poder hidrófilo (Moebius *et al.*, 2000).

1.2.2. Funções

O colesterol é o maior componente lipídico das membranas celulares da maioria das células eucarióticas (Correa-Cerro and Porter, 2005). Encontra-se nas membranas celulares externas (membranas plasmáticas) e na mielina dos sistemas nervoso central (SNC) e periférico (25% dos lípidos da mielina são constituídos por colesterol) (Clayton, 1998 e Nissinen *et al.*, 2000). Muitos processos a nível da membrana, tais como transporte e transmissão de sinais, dependem da fluidez membranar. Nos animais, o colesterol é o principal regulador da fluidez da membrana, devido à sua estrutura (o grupo hidroxilo, que forma pontes de hidrogénio com átomos de oxigénio de um fosfolípido e a cauda hidrocarbonada, que se localiza na zona apolar da bicamada lipídica da membrana). Para além disto, o colesterol forma complexos específicos com alguns fosfolípidos e essas interações modulam a fluidez das membranas, tornando-as menos fluidas (Berg *et al.*, 2002). Os

intermediários esteróis metilados não podem cumprir o papel do colesterol dentro das membranas, o que resulta em mudanças dramáticas na fluidez das mesmas (Herman, 2003). Os esteróis também têm um efeito directo nas proteínas da membrana (Clayton, 1998).

O colesterol é também precursor de uma vasta gama de moléculas esteróides, como os ácidos biliares, oxiesteróides, neuroesteróides, hormonas glicocorticóides, mineralocorticóides e hormonas sexuais como estrogénio e testosterona (Correa-Cerro and Porter, 2005).

É um factor patogénico na hipercolesterolemia familiar e aterosclerose, a maior causa de doença cardiovascular nos homens (Waterham, 2000).

Estudos recentes revelaram um papel adicional do colesterol no desenvolvimento embrionário e morfogénese (Waterham, 2000). As proteínas de sinalização embrionária Hedgehog, envolvidas em numerosos processos de desenvolvimento, são modificadas pela adição de colesterol, o qual é essencial para a acção das referidas proteínas (Herman, 2003).

1.2.3. Absorção e transporte

As duas possíveis fontes de colesterol, no organismo, são a sua síntese e a dieta (Waterham, 2006).

O colesterol e os ésteres de colesterol são essencialmente insolúveis em água, sendo, por esse motivo, transportados no sangue através de lipoproteínas plasmáticas, desde o tecido de origem até ao local de consumo, ou de armazenamento (figura 1.2.). Estes transportadores são complexos macromoleculares de proteínas transportadoras específicas, designadas apolipoproteínas, associados a diferentes quantidades de colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos e triacilgliceróis. Existem várias classes de lipoproteínas – quilomicrons (QM), quilomicrons remanescentes, VLDL, LDL e HDL – sendo a lipoproteína de baixa densidade, a LDL, o principal transportador de colesterol no sangue (Nelson e Cox, 2005).

Devido à sua natureza hidrofóbica, o colesterol não se difunde livremente ao longo de todos os compartimentos celulares, necessitando, desta forma, de um sistema de transporte intracelular (Moebius *et al.*, 2000). As células e tecidos adquirem colesterol, tanto pela sua síntese endógena, como pela captação de colesterol exógeno pelas LDL, que contêm colesterol esterificado (Nelson e Cox, 2005).

O feto necessita de uma grande quantidade de colesterol. Durante o início da gravidez, o colesterol é fornecido pela mãe, enquanto que, à medida que a gravidez avança, o feto

adquire a capacidade de sintetizar o seu próprio colesterol (Waterham, 2006). Tanto na vida fetal, como depois do nascimento, a maioria se não todo o colesterol do cérebro é sintetizado localmente, pois não existe um sistema de transporte do sangue para o cérebro. A glucose é a principal fonte para a síntese de colesterol no cérebro fetal (Kelley and Hennekam, 2000).

Na vida pós-natal, uma dieta rica em colesterol conduz a uma redução da sua síntese endógena no fígado e devido principalmente à inibição da enzima responsável pelo passo limitante da síntese de colesterol, 3-hidroxi-3-metil-CoA reductase (HMGR). Em tecidos extra-hepáticos, a captação de lipoproteínas de colesterol inibe a síntese de colesterol da mesma maneira (Clayton, 1998).

Como a maior parte do colesterol necessário ao desenvolvimento fetal é produzido pelo próprio feto, um défice na biossíntese do colesterol constitui um erro hereditário do metabolismo com expressão pré-natal, manifestando-se habitualmente através de malformações várias, que reflectem a importância das funções que o colesterol desempenha no organismo (Cardoso *et al.*, 2005).

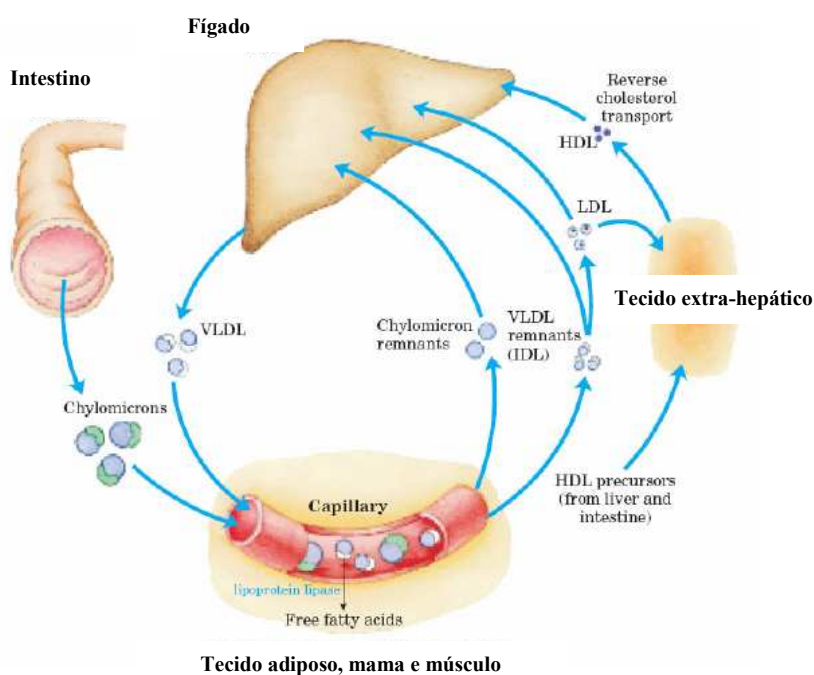
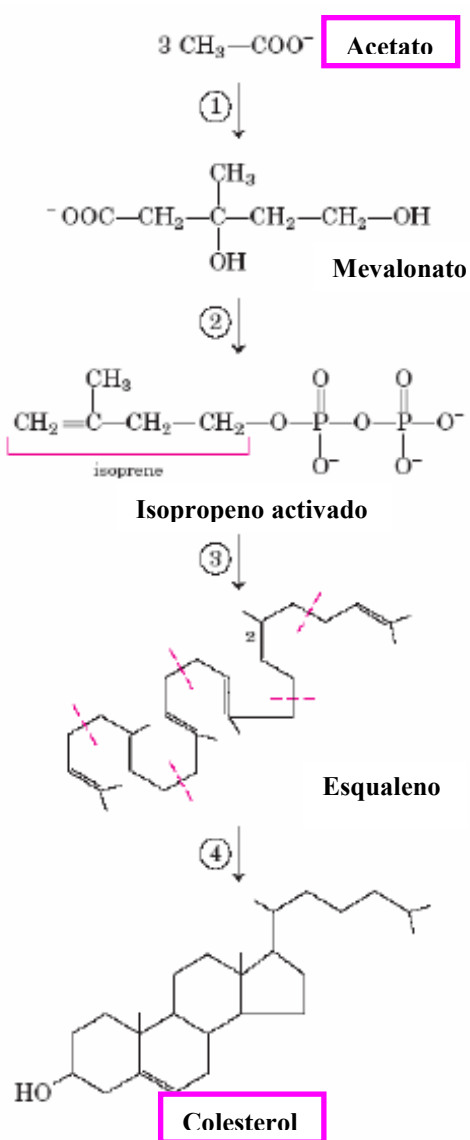


Figura 1.2. Transporte de colesterol, através das diferentes lipoproteínas e transporte de colesterol reverso (retirado de Nelson e Cox, 2005).

1.3. Biossíntese do colesterol

A biossíntese do colesterol ocorre maioritariamente no fígado, uma vez que este contém um número de receptores de LDL suficiente para poder regular a sua biossíntese, de acordo com as necessidades de colesterol celular. A sua estrutura (composto de 27 carbonos) sugere uma via de biossíntese complexa, no entanto, todos os seus carbonos provêm de um único precursor, o acetato, e são sintetizados por uma série de aproximadamente 30 reacções enzimáticas (Nelson e Cox, 2005).



A biossíntese do colesterol decorre em quatro fases:

- ✓ Condensação de três unidades de acetato, formando-se um intermediário com seis carbonos, o mevalonato;
- ✓ Conversão do mevalonato a unidades de isopropeno activadas;
- ✓ Polimerização de seis unidades isopropénicas com cinco carbonos, formando-se esqualeno, uma molécula linear com trinta carbonos;
- ✓ Ciclização do esqualeno, formando os quatro anéis do núcleo esteróide e, formação do colesterol, através de uma série de reacções adicionais (Nelson e Cox, 2005).

Figura 1.3. Esquema resumido das 4 fases da biossíntese do colesterol (retirado de Nelson e Cox, 2005).

O primeiro esterol formado na via de biossíntese do colesterol pós-esqualeno é o lanosterol, um esterol com 30 carbonos formado na ciclização do esqualeno. Múltiplos passos enzimáticos estão envolvidos na conversão dos 30 carbonos do lanosterol nos 27 carbonos do colesterol. Estes incluem a desmetilação no C4 α , C4 β e C14, o que converte a molécula de lanosterol, com 30 carbonos, na molécula de colesterol com 27 carbonos, três reduções das duplas ligações Δ^{14} , Δ^{24} e Δ^7 , uma isomerização da dupla ligação $\Delta^{8(9)}$ para a dupla ligação Δ^7 e, uma desnaturação entre C-5 e C-6, para formar a dupla ligação Δ^5 (Waterham, 2000). Algumas destas reacções enzimáticas têm que acontecer em sequência, por exemplo, a isomerização de Δ^8 - Δ^7 não pode preceder a desmetilação C-14 α . (Herman, 2003). No entanto, a sequência pode variar, dependendo do tecido (Waterham, 2000).

A conversão de lanosterol em colesterol nos últimos passos da via acontece de duas formas: na via Kandutsch-Russell, o precursor imediato do colesterol é o 7-dehidrocolesterol (7-DHC); pela segunda via, o precursor imediato do colesterol é o desmosterol (colest-5(6),24-dien-3 β -ol). A principal via da síntese do colesterol em humanos é a via Kandutsch-Russell (Figura 1.4.), na qual a redução do 7-DHC a colesterol é catalisada pela 3 β -hidroxiesterol Δ^7 -reductase (DHCR7) (Correa-Cerro and Porter, 2005).

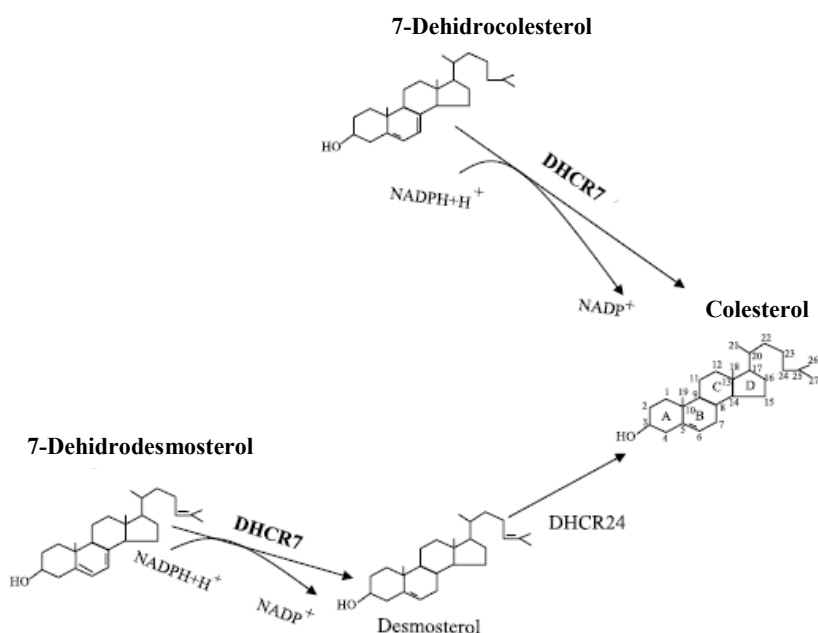


Figura 1.4. Reacções enzimáticas da fase terminal da síntese de colesterol – Via Kandutsch-Russell. A DHCR7 reduz a dupla ligação C7-8 de 7-dehidrocolesterol e de 7-dehidrodesmosterol para formar colesterol e desmosterol, respectivamente. DHCR24 reduz a dupla ligação de C24-25 de desmosterol para formar colesterol. O NADPH é um cofactor de DHCR7 (adaptado de Correa-Cerro and Porter, 2005).

A abundância de ambos os precursores de colesterol pode variar nos diferentes tecidos, embora, o desmosterol seja mais abundante no cérebro, testículos e glândulas exócrinas do peito (Herman, 2003). Na síntese do desmosterol, a enzima DHCR7 catalisa a redução do 7-dehidrodesmosterol em desmosterol (Correa-Cerro and Porter, 2005).

As duas vias partilham muitas enzimas e uma deficiência numa das enzimas, afecta seriamente a síntese de colesterol. Algumas das reacções requerem a participação de uma proteína transportadora de esterol (Clayton, 1998).

1.3.1. Localização celular das enzimas da biossíntese do colesterol

As enzimas envolvidas na biossíntese de colesterol são pouco específicas e podem metabolizar vários intermediários. A especificidade do substrato pode variar entre os tecidos e/ou depender da actividade das diferentes enzimas, que são reguladas por factores intracelulares, que operam nos diferentes tecidos (Waterham, 2000). Estas enzimas estão divididas por vários compartimentos: citosol, retículo endoplasmático (RE) e/ou peroxissomas (Waterham, 2006).

As primeiras sete enzimas da biossíntese de colesterol são proteínas solúveis, com a excepção da HMGR, que é uma proteína integral da membrana do RE, produzida no citosol (Herman, 2003).

Nos peroxissomas actuam enzimas envolvidas na biossíntese de colesterol pré-esqualeno, como HMGR, mevalonato cinase, fosfomevalonato cinase, fosfomevalonato descarboxilase, isopentenildifosfato isomerase e farnesil pirofosfato sintase. As restantes reacções da biossíntese acontecem no RE com enzimas e substratos que estão ligados à membrana (Moebius *et al.*, 2000; Herman, 2003).

Além disso, algumas das enzimas colesterogénicas estão também (ex: esterol $\Delta^{8(9)}$ -isomerase) ou principalmente (ex: LBR/esterol Δ^{14} -reductase) localizadas na membrana nuclear (Waterham, 2006).

1.3.2. Papel dos intermediários da biossíntese do colesterol

Intermediários isoprenóides da via pré-esqualeno são precursores para a síntese de isoprenos não esteróides como o isopentenil-tRNAs, dolicol, ubiquinona, Heme A e grupos farnesil e geranylgeranyl. O isopentenilo liga-se aos tRNAs, o que permite a estabilização da interacção codão-anticodão, prevenindo uma má leitura do código genético durante a síntese

proteica. O dolicol é um componente essencial para N-glicosilação das proteínas; a ubiquinona e heme A são parte importante da cadeia respiratória mitocondrial, pois permitem o transporte de electrões na mitocôndria; e os grupos farnesil e geranylgeranil ligam-se às membranas das células (Clayton, 1998; Herman, 2003).

Vários intermediários esteróis da via pós-esqualeno têm funções celulares adicionais. Os derivados desmetilados C-14 do lanosterol, 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,14,24-trien-3 β -ol e 4,4-dimetil-5 α -colesta-8,24-dien-3 β -ol têm actividade de estimulação da meiose e acumulam-se nos ovários e testículos, respectivamente. Na maioria dos tecidos, o 7-DHC é o último precursor na via de biossíntese de colesterol, no entanto, na pele, o 7-DHC é também utilizado para a síntese de vitamina D₃, que é formada a partir da pró-vitamina D₃, produzida pelo 7-DHC por radiação UV (Waterham, 2000).

O colesterol e outros intermediários esteróis podem ser convertidos em oxiesteroídes, que podem actuar como moléculas sinalizadores e podem ligar-se a receptores nucleares como o LXR α . As proteínas de sinalização Hedgehog, envolvidas nos processos de desenvolvimento, são modificadas e activadas pela adição de colesterol (Herman, 2003).

Esta complexa via da biossíntese do colesterol está intimamente interligada com variadas funções celulares e com vias de sinalização (Herman, 2003).

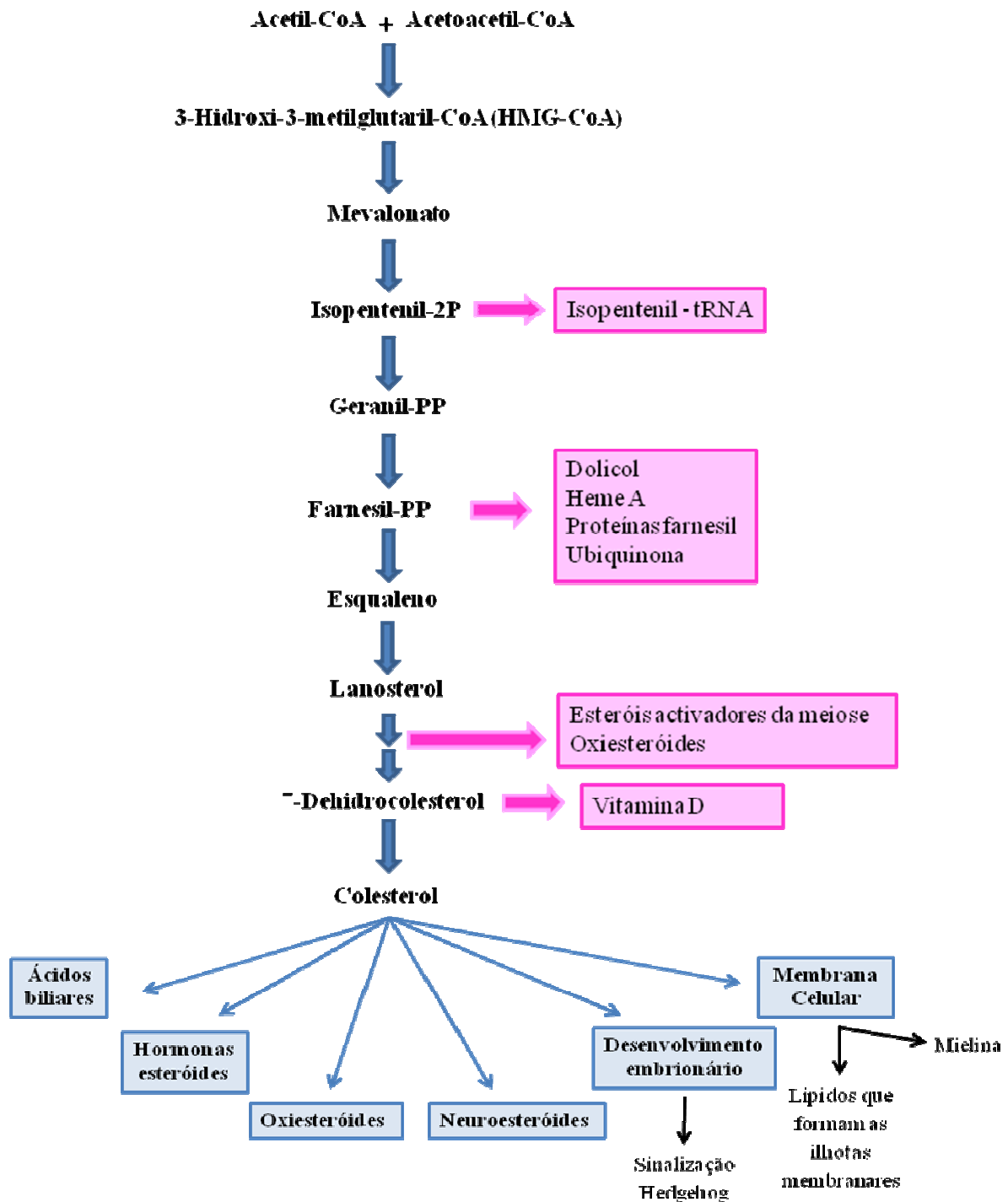


Figura 1.5. Via de biossíntese de colesterol. Os compostos não esteróides e os intermediários da via de biossíntese de colesterol são apresentados em rosa (adaptado de Herman, 2003 e Porter, 2008).

1.3.3. O colesterol e seus derivados

O colesterol é um precursor de moléculas esteróides importantes: sais biliares, hormonas esteróides e vitamina D.

1.3.3.1. Síntese de sais biliares

O colesterol pode ser excretado através de duas vias diferentes: secreção directa na biliar, ou através da conversão em ácidos biliares (principal via de excreção do colesterol). Os sais biliares são derivados polares do colesterol, sintetizados no fígado, armazenados e concentrados na vesícula biliar e libertados no intestino delgado. A conversão em ácidos biliares ocorre através de uma série de reacções, na presença de oxigénio, NADPH e citocromo P450, onde a enzima 7 α -hidroxilase exerce um controlo maioritário sobre a via (Berg *et al.*, 2002).

1.3.3.2. Síntese de hormonas esteróides

O colesterol é precursor das cinco classes principais de hormonas esteróides: (i) progestogénios, (ii) glucocorticóides, (iii) mineralocorticóides, (iv) androgénios e (v) estrogénios. Estas hormonas são moléculas sinalizadoras que regulam um grande número de funções no organismo. Os seus locais de síntese são: o corpo amarelo para progestogénios; os ovários para estrogénios; os testículos para androgénios; e o córtex supra-renal para os glucocorticóides e mineralocorticóides (Berg *et al.*, 2002).

1.3.3.3. Síntese de vitamina D

O 7-DHC (pró-vitamina D₃) é o precursor da vitamina D, a qual exerce um papel essencial no controlo do metabolismo de cálcio e fósforo. O 7-DHC é lisado pela luz ultravioleta a pré-vitamina D₃, que se isomeriza espontaneamente para vitamina D₃. A vitamina D₃ (colecalfiferol) é transformada em calcitriol (1,25-dihidroxi-colecalfiferol), a hormona activa, por reacções de hidroxilação no fígado e nos rins (Berg *et al.*, 2002).

1.3.4. Regulação da biossíntese do colesterol

A biossíntese do colesterol é um processo complexo e dispendioso em termos de energia e é regulado através de diversos mecanismos.

O passo em que há maior controlo na via metabólica de biossíntese de colesterol é a conversão de 3-hidroxi-3-metilglutamil-CoA (HMG-CoA) a mevalonato, reacção catalisada pela HMGR, enzima sob a qual actuam a maioria dos mecanismos reguladores. A enzima existe em duas isoformas interconvertíveis: a forma desfosforilada (forma activa e que correspondente à forma nativa) e forma fosforilada (forma inactiva) (Berg *et al.*, 2002).

Existe também uma regulação hormonal da via de biossíntese de colesterol, através do par agonista/antagonista - insulina/glucagon, em que a insulina conduz a uma diminuição do cAMP, activando a via de biossíntese de colesterol e, através do estímulo inverso, o glucagon que conduz à inibição da biossíntese de colesterol. Deste modo, a insulina promove a desfosforilação da HMGR e, por outro lado, o glucagon estimula a fosforilação desta enzima, ficando esta no seu estado inactivo (figura 1.6.) (Berg *et al.*, 2002).

O controlo a longo prazo da actividade da HMGR é exercido, principalmente pela regulação da síntese e da degradação da enzima, nomeadamente através de vários mecanismos: a regulação transcripcional do gene (acontece por feedback em resposta aos níveis de esterol e é mediada por dois membros da família *SREBPs*, *proteínas de ligação a elementos de regulação de esteróis* (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*)); a eficiência de tradução de mRNA; a eficiência catalítica por fosforilação/desfosforilação; a taxa de degradação de proteína; e a modulação da actividade enzimática (Waterham, 2006).

A HMGR contém um domínio sensível ao esterol e, quando as concentrações de esteróis são altas, há ubiquitinação ou degradação proteossomal da HMGR. A ubiquitinação é estimulada pelo lanosterol ou por oxisteróides, como o 25-hidroxiesteróide. Os oxisteróides podem também regular a HMGR por supressão da transcrição do gene. A degradação proteossomal da HMGR aumenta com isoprenos não esteróis, incluindo derivados farnesil e geranylgeranyl (Waterham, 2006).

Para além da regulação da biossíntese do colesterol, através da actividade da enzima HMGR, existe também um controlo da quantidade de colesterol livre, com base na actividade da enzima acil-CoA-colesterol-acil-transferase (ACAT). Quando as concentrações intracelulares de colesterol são elevadas há activação da ACAT, aumentando, desta forma, a esterificação do colesterol para o seu armazenamento, o que conduz a uma redução dos níveis de colesterol livre (Berg *et al.*, 2002).

Para a homeostase do colesterol, as células dos vertebrados devem integrar num todo: a síntese de esteróis; a captação de colesterol da circulação por meio de um receptor LDL; o armazenamento intracelular de ésteres de colesterol; a incorporação de colesterol nas membranas celulares; e a sua secreção através das lipoproteínas. As células especializadas do fígado e as da glândula adrenal e gónadas também controlam a quantidade de colesterol necessária para síntese de ácidos biliares, hormonas e esteróis, respectivamente (Moebius *et al.*, 2000).

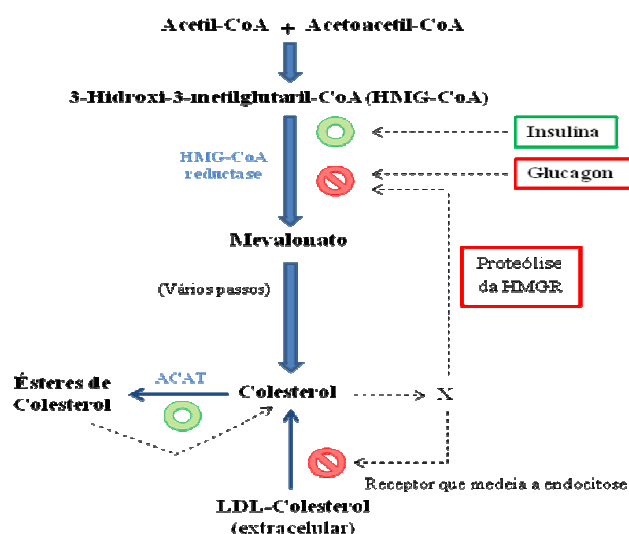


Figura 1.6. Regulação da via de biossíntese do colesterol (adaptado de Nelson e Cox, 2005).

1.4. Aspectos bioquímicos da enzima 7-dehidrocolesterol reductase

Nome da enzima: 3 β -hidroxiesterol Δ^7 -reductase; 7-dehidrocolesterol reductase (DHCR7);

E.C.: 1.3.1.21.

Classe: Oxidoreductases

Reacção catalisada:



A proteína 3 β -hidroxiesterol Δ^7 -reductase (DHCR7) tem actividade catalítica nas leveduras e pertence à família das proteínas esterol reductases. Proteínas relacionadas com esta família são: o receptor humano da lâmina B (uma proteína nuclear que também exhibe actividade de esterol Δ^{14} -reductase); o produto do gene humano *TM7SF2* (função a qual não é conhecida); e as esterol Δ^{14} - e $\Delta^{24(28)}$ - reductases das leveduras. As enzimas esterol reductases são proteínas com actividade enzimática, capazes de reduzir um substrato esterol em diferentes posições com elevada especificidade (Moebius *et al.*, 2000).

A DHCR7 é capaz de catalisar a redução da dupla ligação Δ^7 de vários substratos esteróis. A sua actividade tem sido detectada em diversos organismos. Nos mamíferos, o

principal substrato para a enzima DHCR7 é o 7-DHC, a qual se expressa maioritariamente na glândula adrenal, fígado, testículos e tecido cerebral (Correa-Cerro and Porter, 2005).

A redução de 7-DHC a colesterol requer NADPH como cofactor. Durante a conversão de 7-DHC a colesterol, há transferência directa de um hidrogénio do NADPH para a posição 7 α do colesterol e o hidrogénio-8 β , provem da água (ver figura 1.4.). Um recente estudo demonstrou que a actividade de DHCR7 nos microsomas e depois da reconstituição em lipossomas é dependente da presença do NADPH citocromo P-450 oxidoreductase, sugerindo um possível papel para esta última enzima na transferência de electrões de NADPH para DHCR7. Logo, a actividade de NADPH citocromo-P450 oxidoreductase é essencial para a enzima DHCR7 catalisar a redução de 7-DHC (Correa-Cerro and Porter, 2005).

Muitos estudos têm demonstrado que a actividade da DHCR7 está localizada nos microsomas (Shefer *et al.*, 1998 e Porter, 2008). No entanto, foi também sugerido que a actividade da enzima possa estar localizada nos peroxissomas, organelos que fazem parte das etapas iniciais da biossíntese de colesterol (Waterham, 2000).

Para além disso, a actividade de DHCR7 é fortemente inibida por EDTA, efeito que pode ser parcialmente corrigido pela adição de Fe³⁺, sugerindo que DHCR7 é uma proteína dependente de ferro (Waterham, 2000).

Shefer *et al.* (1998), caracterizou a especificidade do substrato de DHCR7 e, embora menos eficiente que a redução de 7-DHC, este grupo demonstrou que DHCR7 é também capaz de reduzir a dupla ligação do C7-8 no anel B do ergosterol, 7-dehidrositosterol e 7-dehidroepicolesterol (Correa-Cerro and Porter, 2005).

1.4.1. Expressão enzimática

O cDNA de *DHCR7* foi clonado em 1998 por três grupos independentes (Moebius *et al.*, 1998; Wassif *et al.*, 1998; Fitzky *et al.*, 1998). O cDNA humano de *DHCR7* codifica uma proteína de 475 aminoácidos, que tem um peso molecular de 54,489 kDa e um ponto isoeléctrico (pI) de 9,05 (Correa-Cerro and Porter, 2005).

A DHCR7 tem o domínio esterol reductase 1, SR1, (aminoácidos 213-228) e o domínio esterol reductase 2, SR2, (aminoácidos 439-462). Para além dos domínios SR1 e SR2, a DHCR7 também tem um domínio de sinalização esterol reductase, SRSM (aminoácidos 394-405), o qual contém possivelmente o local de ligação ao NADPH (Correa-

Cerro and Porter, 2005; Waterham, 2000; Yu and Patel, 2005). Também estão presentes na DHCR7 múltiplos potenciais locais de fosforilação (Correa-Cerro and Porter, 2005).

Embora a enzima DHCR7 necessite de NADPH como cofactor para a redução da dupla ligação Δ^7 , não foi até ao momento identificado na sequência de aminoácidos, nenhum consenso óbvio para o específico local de ligação ao NADPH. No entanto, como a necessidade de NADPH é uma característica comum das esterol reductases, é esperado que o domínio que envolve a ligação de NADPH, esteja presente na parte conservada C-terminal da proteína. Por outro lado, o corolário da recente descoberta de que a actividade da enzima DHCR7 é dependente em NADPH-citocromo P-450 oxidoreductase pode indicar que NADPH não se liga directamente à DHCR7 (Waterham, 2000).

O domínio C-terminal da DHCR7 é fortemente conservado, o que sugere que este forme a fenda catalítica e o local de ligação ao substrato (Moebius *et al.*, 2000).

O alinhamento das sequências de aminoácidos de DHCR7 humano, dos ratos e homólogos de rato, da esterol Δ^7 -reductase de *A. thaliana*, do domínio C-terminal do receptor lâmina B humano, da esterol Δ^{14} -reductase humana e os esteróis Δ^{14} - e $\Delta^{24(28)}$ - reductases de *S. cerevisiae*, revela um alto grau de homologia da sequência entre todas as reductases, em particular, a metade C-terminal das proteínas. Isto sugere, que a metade N-terminal divergente pode determinar a especificidade das várias reductases, relativamente à redução de uma determinada dupla ligação, enquanto que a metade C-terminal pode constituir, mais propriamente, o local catalítico e/ou de ligação para as moléculas esteróis (Waterham, 2000).

Esta hipótese é suportada pela identificação de um domínio sensível ao esterol na metade C-terminal do DHCR7 de rato (resíduos de aminoácidos 177-358) e que é conservado no homólogo humano (resíduos de aminoácidos 181-362). Tais domínios sensíveis ao esterol, têm sido identificados em várias proteínas implicadas na biossíntese de colesterol, no transporte e na homeostase, ou vias de sinalização dependentes de colesterol, incluindo HMGR, SCAP (proteína activadora da clivagem de SREBP (proteína de ligação a elementos de regulação de esteróis)) e NPC1 (proteína de Niemann-Pick tipo C) (Waterham, 2000).

Para além do elevado grau de semelhança da sequência, as várias reductases dos esteróis partilham uma conservação significativa a nível estrutural, nomeadamente, a presença e localização das múltiplas hélices associadas à membrana (MAHs) (Waterham, 2000).

1.4.2. Topologia transmembranar

Como a DHCR7 é uma proteína integrada na membrana, existem vários modelos que têm sido propostos para a sua topologia transmembranar. Fitzky *et al.* (2001), propôs um modelo com 9 domínios transmembranares, baseando-se na suposição que todas as nove hélices associadas à membrana (MAHs) formem um segmento transmembranar e, tendo em conta a analogia com o receptor da lâmina B, o terminal N seja orientado para o citosol (figura 1.7.A.). Waterham e Wanders (2000), propuseram um modelo mais conservativo com 6 domínios transmembranares (figura 1.7.B) (Correa-Cerro and Porter, 2005).

Ambos os modelos supõem que o terminal amino da proteína está localizado no lado citosólico da membrana. Os dois modelos propostos diferem na orientação do terminal carboxilo relativamente ao citosol. No modelo de Fitzky *et al.* (2001), a localização dos domínios extramembranares está envolvida com a ligação de NADPH (Correa-Cerro and Porter, 2005).

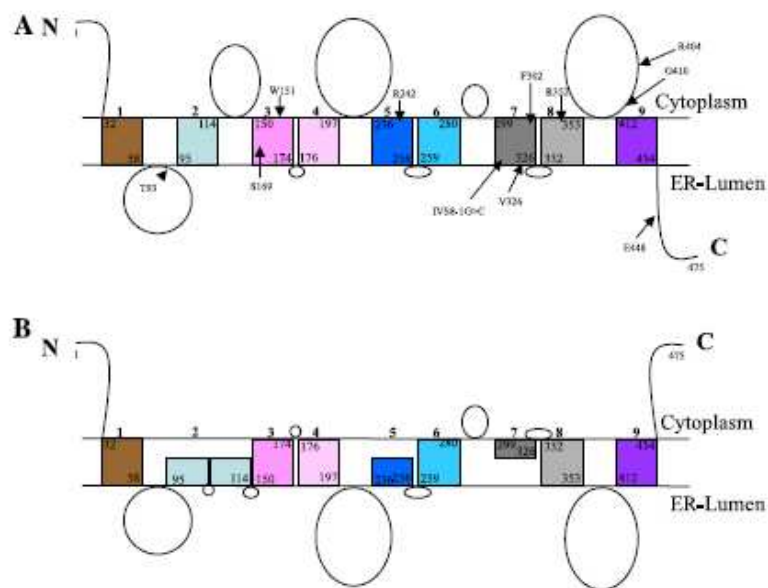


Figura 1.7. Topologia da membrana prevista para DHCR7. (A) Modelo dos nove domínios transmembranares de DHCR7 proposto por Fitzky *et al.* Localização das MAHs: 1, W37-F57; 2, Y100-C118; 3, A150-F174; 4, W177-F202; 5, K236-A257; 6, V266-W286; 7, L306-V326; 8, Q331-F351; 9, L412-I434. Os locais de mutações comuns de DHCR7 estão indicados por setas. (B) Modelo dos seis domínios transmembranares de DHCR7 proposto por Waterham e Wanders. As regiões transmembranares/intramembranares previstas estão indicadas por cores (retirado de Correa-Cerro and Porter, 2005).

1.4.3. Especificidade

Apenas os esteróis que: (i) têm uma dupla ligação no C-7,8, mas que diferem na orientação do grupo hidroxilo no anel A (ex: 7-dehidroepicolesterol), (ii) que possuem ligação dupla no C-5 do anel B (ex: latosterol), ou (iii) têm a adição de substituintes e uma ligação dupla na cadeia lateral (ex: ergosterol e 7-dehidrositosterol), são substratos possíveis para a enzima DHCR7 (figura 1.8.) (Shefer *et al.*, 1998).

O ergosterol difere do 7-DHC, por uma ligação dupla adicional no C-22 e por um grupo metilo no C-24; o 7-dehidrositosterol contém um substituinte etilo extra no C-24; o 7-dehidroepicolesterol tem uma orientação α no grupo hidroxilo no C-3; e latosterol contém apenas uma única dupla ligação no anel B, em C-7,8 (Shefer *et al.*, 1998).

O máximo de actividade enzimática acontece quando o substrato é o 7-DHC. Esta actividade é 4 vezes mais alta do que quando o ergosterol, o 7-dehidrositosterol, ou o 7-dehidroepicolesterol são os substratos (Shefer *et al.*, 1998).

Quando o latosterol é o “substrato” não há redução da dupla ligação C-7,8, logo, o latosterol não interage com a enzima, uma vez que o latosterol é um esterol 5α -dihidrosaturado e não tem dupla ligação em C-5,6. Assim, uma ligação dupla em C-5,6 no anel B é essencial para a redução da dupla ligação em C-7,8. Além disso, substituições na cadeia lateral e uma alteração da orientação do grupo hidroxilo em C-3 reduzem a eficiência catalítica da enzima DHCR7. Quando o substrato, 7-DHC, é modificado pela: (i) adição de substituintes, (ii) por uma dupla ligação na cadeia lateral apolar, ou (iii) pela epimerização da 3β -hidroxi para uma 3α -configuração no anel A, a actividade de DHCR7 é anulada. Logo, o requerimento mais específico para a redução da dupla ligação em C-7,8 é a presença da dupla ligação em C-5,6 (Shefer *et al.*, 1998).

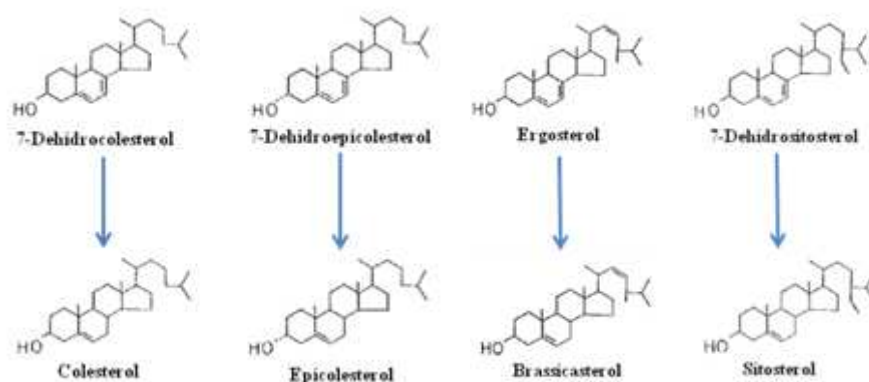


Figura 1.8. Possíveis substratos para DHCR7 e produtos da reacção (adaptado de Shefer *et al.*, 1998).

1.4.4. Inibidores

O ergosterol e o 7-dehidroepicolesterol são potentes inibidores da enzima, mais do que o 7-dehidrositosterol. O ergosterol é um inibidor competitivo da actividade de DHCR7, tal como o 7-dehidrositosterol e o 7-dehidroepicolesterol, uma vez que concentrações elevadas destes compostos inibem competitivamente a enzima. Estes três esteróis, estruturalmente semelhantes, sofrem redução da dupla ligação em C-7,8 e inibem competitivamente a redução de 7-DHC a colesterol, pela sua ligação ao local activo da enzima. O latosterol, por sua vez, não inibe a actividade da DHCR7 (Shefer *et al.*, 1998).

Outros potentes inibidores da enzima DHCR7 são o AY 9944 (1,4-bis (2-diclorobenzilaminometil) ciclohexano) e BM 15.766 (ácido 4-(2-[1-(n-clorocinamil) piperazina-4-il] etil) benzóico). Estes dois compostos, não esteróis, não estão estruturalmente ou quimicamente relacionados com o 7-DHC, uma vez que apresentam propriedades físicas diferentes, mas inibem a DHCR7 *in vivo* e produzem anomalias congénitas semelhantes às do Síndrome Smith-Lemli-Opitz (SLO), quando administrados a ratos (Shefer *et al.*, 1998). Estes inibidores são derivados de piperazina e são frequentemente usados para estudos da enzima e para a criação de modelos animais com deficiência de DHCR7 (Waterham, 2000).

Os inibidores AY 9944 e BM 15.766 são inibidores mais poderosos para a enzima do que os inibidores competitivos, ergosterol, 7-dehidrositosterol e 7-dehidroepicolesterol (Shefer *et al.*, 1998).

Roux e colaboradores demonstraram que o bloqueio da biossíntese de colesterol através de AY 9944 provoca um efeito teratogénico. Quando AY 9944 ou BM 15.766 são adicionados a ratos, durante os primeiros dias de gestação, aparecem malformações típicas de SLO. Os níveis de colesterol materno diminuem e o precursor, 7-DHC, aumenta substancialmente (Salen *et al.*, 1996). O mesmo grupo também demonstrou que uma dieta de colesterol bloqueia os efeitos teratogénicos do AY-9944 nestes ratos. O AY 9944 é 500 vezes mais potente que o BM 15.766. Ambos os compostos são inibidores não-competitivos da enzima DHCR7 e tanto podem ligar-se à enzima livre como ao complexo enzima-substrato, num local diferente do local activo (Kelley and Hennekam, 2000).

1.4.5. Regulação da actividade

A actividade da DHCR7 é regulada por fosforilação/desfosforilação. Estudos com preparações de microssomas na presença de NaF (que inibe fosfatases endógenas) mostram

um aumento significativo da actividade de DHCR7. A incubação de microssomas, com fosfatase alcalina (desfosforilação), reduz significativamente a actividade da enzima. Também, a incubação de microssomas com $MgCl_2$ e ATP (fosforilação) aumenta significativamente a actividade de DHCR7, quando comparado com a adição isolada de $MgCl_2$. Logo, Mg-ATP activa a enzima. A adição de cAMP ou da proteína cinase dependente de cAMP aos microssomas não permite obter uma forte activação da enzima DHCR7 (Shefer *et al.*, 1998).

Em resumo, a enzima DHCR7 é inibida por desfosforilação e a actividade da enzima aumenta através de uma fosforilação (Shefer *et al.*, 1998).

1.5. Défices da biossíntese do colesterol

Até ao momento foram descritas 9 doenças hereditárias distintas ligadas a diferentes defeitos na biossíntese de colesterol. Apenas duas delas são conhecidas como resultado de um defeito enzimático no segmento da via pré-esqualeno: a forma clássica de acidúria mevalónica (MIM 251170) e a síndrome de hiperimmunoglobulinemia D com febre recorrente (MIM 260920). As restantes sete doenças são causadas por diferentes defeitos enzimáticos no segmento da via pós-esqualeno (Waterham, 2000).

Os defeitos genéticos nas enzimas responsáveis pela biossíntese pós-esqualeno de colesterol têm emergido como causas importantes de síndromes polimalformativas congénitas (Tabela 1.2. e 1.3.). Todas estas síndromes estão ligadas a uma deficiência numas das enzimas requeridas para a formação de colesterol a partir de lanosterol. Os doentes com estas doenças apresentam malformações, que envolvem diferentes órgãos e sistemas (Waterham, 2000).

Tabela 1.2. Défices na biossíntese de colesterol pós-esqualeno (Adaptado de Nwokoro *et al.*, 2001; Porter, 2002; Herman, 2003; Yu and Patel, 2005).

Doença	Número MIM	Enzima	Substrato acumulado	Hereditariedade	Gene	Localização Cromossómica
Síndrome de Smith-Lemli-Optiz	270400	3 β -hidroxiesterol Δ^7 -reductase	7-DHC ou 8-DHC	A.R.	<i>DHCR7</i>	11q12-13
Desmosterolose	602398	3 β -hidroxiesterol Δ^{24} -reductase	Desmosterol	A.R.	<i>DHCR24</i>	1p31.1-1p33
Latosterolose	607330	3 β -hidroxiesterol Δ^5 -desaturase	Latosterol	A.R.	<i>SC5D</i>	11q23.3
CDPX2	302960	3 β -hidroxiesterol $\Delta^{8,7}$ -isomerase	8-DHC e Colesta-8(9)-en-3 β -ol	X.D.	<i>EBP</i>	Xp11.22-11.23
CHILD	308050	3 β -hidroxiesterol desidrogenase	Latosterol e esteróis 4-metilados	X.D.	<i>NSDHL</i>	Xq28
Displasia Greenberg	215140	3 β -hidroxiesterol Δ^{14} -reductase	Colesta-8,14-dien-3 β -ol e Colesta-8,14,24-trien-3 β -ol	A.R.	<i>LBR</i>	1q42.1
Síndrome Antley-Bixler	207410	Lanosterol 14 α -demetilase	Lanosterol e dehidrolanosterol	A.R.	<i>CYP51</i>	7q21.2-7q21.3

Legenda: A.R.: Autossómica recessiva; X.D.: Dominante, ligada ao X; *DHCR7*: 7-dehidrocolesterol reductase; *DHCR24*: Desmosterol reductase; *SC5D*: Esterol C5-desaturase; *EBP*: Proteína de ligação a Emopamil; *NSDHL*: NADH esterol desidrogenase; *LBR*: Receptor da lâmina B; *CYP51*: Citocromo P51.

Existem algumas características fenotípicas comuns entre as patologias nomeadamente, malformações e dismorfias faciais, o que sugere que perturbações na via de biossíntese de colesterol têm fortes efeitos teratogénicos (Herman, 2003).

A patogénese das doenças da biossíntese do colesterol está associada a: (i) carência de colesterol ou dos esteróis relacionados; (ii) acumulação de intermediários tóxicos; (iii) anormal regulação por feedback nos passos iniciais da via, incluindo a síntese de compostos isoprenóides; (iv) e/ou anormal sinalização pelas proteínas Hedgehog, que normalmente contêm colesterol ligado. Alguns dos efeitos teratogénicos nestas desordens são resultantes de uma carência em colesterol para a sua incorporação nas membranas, particularmente no SNC (Herman, 2003). A maioria das patologias autossómicas recessivas da biossíntese de colesterol não só estão associadas com a baixa concentração de colesterol, mas também com

as baixas concentrações de esteróis totais, indicando uma perturbação na regulação da biossíntese dos esteróis, provavelmente devido a determinados intermediários inibirem os mecanismos de SREBP (proteína de ligação a elementos de regulação de esteróis), o que resulta numa diminuição da transcrição de genes envolvidos na síntese de esterol (Waterham, 2006).

Tabela 1.3. Aspectos clínicos observados nas doenças humanas da biossíntese pós-esqualeno de colesterol (Adaptada de Moebius *et al.*, 2000; Nwokoro *et al.*, 2001; Herman, 2003).

Manifestações clínicas	Displasia Greenberg	CHILD	CDPX2	Latosterolose	SLO	Desmosterolose
Esqueleto	Membros muito curtos; Nanismo; Polidactilia pós-axial	Encurtamento dos membros;	Condrodisplasia punctata; Pequena Estatura; Polidactilia pós-axial	Polisindactilia pós-axial	Sindactilia no 2.º e 3.º dedo do pé; Polidactilia; Microcefalia	Osteoclerose; Membros pequenos; Macrocefalia
Pele	Hidropsia	Unhas anormais; Alopecia; Ictiose	Ictiose; Alopecia	-	Hipersensibilidade à luz	-
Órgãos genitais externos	Normal	Normal	Normal	Hipospadias; Criptorquidia	Ambiguidade genital	-
Rins	-	-	Normal	-	Hipoplasia; Agenesia	Hipoplasia
Tracto Gastrointestinal	-	-	Normal	Doença colestática do fígado	Doença Hirschsprung's; Estenose pilórica	Intestino delgado pequeno
Pulmões	Hipoplasia; Lobulação anormal	Hipoplasia	Normal	-	Hipoplasia; Lóbulos reduzidos	Hipoplasia; Drenagem venosa anormal
Cérebro	-	Algumas malformações; Inteligência normal	Normal; Ocasionalmente algumas malformações; Inteligência Normal	Atraso mental	Atraso mental	Hidrocefalia; Hipoplasia do cerebelo
Face	Dismorfia Facial	Dismorfia facial	Cataratas	-	Cataratas; Fenda palatina; Micrognatia; Retrognatia	Fenda palatina

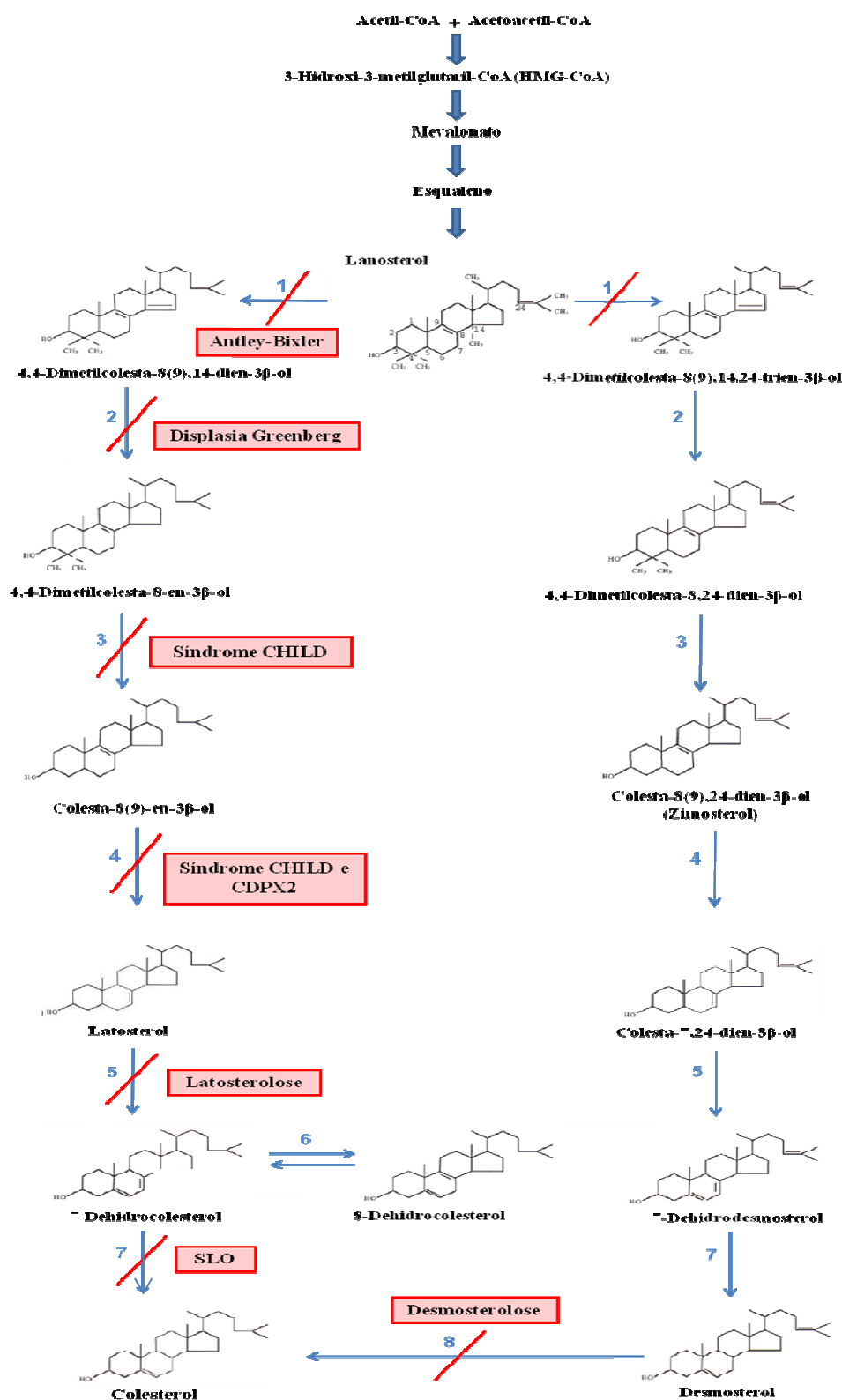


Figura 1.9. Biossíntese de colesterol. Defeitos na biossíntese de colesterol, devido a défices nas enzimas: (1) lanosterol 14 α -demetilase, (2) 3 β -hidroxiesterol Δ^{14} -reductase, (3) complexo esterol C-4 demetilase, (4) e (6) esterol Δ^8 - Δ^7 -isomerase, (5) esterol Δ^5 -desaturase (latosterol desidrogenase), (7) 3 β -

hidroxiesterol Δ^7 -reductase, (8) 3β -hidroxiesterol Δ^{24} -reductase (adaptado de Waterham, 2006, Herman 2003 e Porter, 2002).

1.6. Síndrome Smith-Lemli-Opitz

A síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO, MIM 270400) é uma doença genética da biossíntese do colesterol, de transmissão autossómica recessiva, caracterizada por um padrão de dismorfias faciais minor, alterações dos membros e malformações congénitas múltiplas (Cardoso *et al.*, 2005). O SLO caracteriza-se por níveis reduzidos de colesterol, níveis elevados de 7-dehidrocolesterol (7-DHC), tal como dois outros esteróis, o 8-dehidrocolesterol (8-DHC) e o 19-nor-5,7,9(10)-colestatrien- 3β -ol (9-DDHC), no plasma e tecidos (Clayton, 1998).

Em 1964 Smith, Lemli, e Opitz descreveram três doentes do sexo masculino com dismorfias faciais semelhantes, atraso mental, microcefalia, atraso de desenvolvimento e hipospadias e designaram a nova doença como a síndrome de RSH (as iniciais RSH são referentes ao nome dos primeiros três doentes). Mais tarde, esta entidade clínica passou a ser designada por síndrome Smith-Lemli-Opitz (SLO) (Porter, 2002). A descrição de novos casos de SLO nos anos seguintes permitiu conhecer melhor as características fenotípicas da síndrome (Kelley and Hennekam, 2000).

Nos anos 80 foram descritas diversas anomalias no metabolismo dos esteróis em doentes com SLO. Natowicz e Evans (1994), descobriram que doentes com SLO possuíam concentrações anormais de ácidos biliares na urina e, uma análise dos esteróis no plasma de um doente, evidenciou um aumento de 1000 vezes mais dos níveis de 7-DHC, sugerindo uma deficiência da enzima DHCR7, que catalisa o último passo da via Kandutsch-Russell da biossíntese de colesterol - a conversão de 7-DHC em colesterol (Kelley and Hennekam, 2000).

Cinco anos depois do defeito bioquímico ter sido identificado, foi clonado o gene *DHCR7* e diversas mutações foram identificadas em doentes com SLO (Correa-Cerro and Porter, 2005).

Com base no fenótipo clínico observado, foram descritas duas formas de SLO: o tipo II, correspondente a uma apresentação grave e incompatível com a vida e o tipo I, que inclui os fenótipos menos graves da patologia. Em vários estudos de determinação da actividade de

DHCR7 em hepatócitos e fibroblastos, confirmou-se que há um défice na última enzima na via de biossíntese de colesterol em ambos os fenótipos de SLO (Salen *et al.*, 1996).

A caracterização bioquímica e, mais recentemente, molecular de doentes com esta patologia, permitiu estabelecer que ambas as formas são causadas por diferentes mutações no mesmo gene e que os doentes com esta síndrome têm uma gama contínua de sinais, sintomas e alterações bioquímicas, desde forma leves, a severas e até letais (Waterham, 2000). Sendo as bases bioquímicas e moleculares as mesmas, os fenótipos traduzem simplesmente diferentes níveis de actividade enzimática residual (Cardoso *et al.*, 2005).

1.6.1. Incidência

O SLO é o defeito da biossíntese de colesterol mais frequente e é considerado como uma das doenças autossómicas recessivas mais comuns, depois da fibrose cística e fenilcetonúria, na população Caucasiana Norte Americana (Yu and Patel, 2005).

A incidência de SLO estimada varia entre 1/10.000 a 1/60.000 nados vivos, dependendo da região. O SLO parece ser mais prevalente entre a população de descendência Caucasiana, do que na população de origem Asiática ou Africana (Yu and Patel, 2005). Porter, no seu artigo de revisão mais recente, descreve uma incidência para SLO que varia entre 1/20.000 a 1/70.000 (Porter, 2008).

Com base em casos confirmados bioquimicamente, foi estimada uma incidência de aproximadamente 1/60.000 nascimentos no Reino Unido e Estados Unidos da América. Uma incidência de aproximadamente 1/80.000 nascimentos foi confirmada bioquimicamente e geneticamente na Holanda (Waterham, 2000).

Há, porém, uma discrepância entre a incidência de SLO e a prevalência de portadores de alelos mutantes de *DHCR7*. Um rastreio na população, para o alelo mutante mais frequente de *DHCR7*, sugere uma frequência de portadores nas populações caucasianas de 3 a 4%, que indicaria uma hipotética incidência de nascimentos com SLO de aproximadamente 1/2500 – 1/4500. Esta discrepância sugere que a verdadeira incidência possa ser mais elevada e que existem casos não diagnosticados de indivíduos com formas leves da doença (Yu and Patel, 2005). Mutações severas, como a homozigotia para alelos nulos, podem resultar em letalidade intra-uterina ou perinatal. A mortalidade pré-natal para os casos de doentes com formas graves de SLO pode ser muito alta (80%), pelo que, casos de aborto espontâneo prematuro podem distorcer a verdadeira incidência de SLO (Yu and Patel, 2005).

1.6.2. Aspectos clínicos

Crianças com um fenótipo severo de SLO, morrem frequentemente devido a anomalias congénitas múltiplas (tabela 1.4. e figura 1.10.). Reciprocamente, indivíduos com espectro fenotípico moderado demonstram ter só problemas físicos secundários, tais como problemas de comportamento e autismo (Porter, 2002).

Durante a infância e a adolescência, crianças com SLO têm um aumento no número de infecções, sendo as mais comuns as otites, infecções na pele e pneumonias. A morte devido a infecções não é rara nas crianças com SLO, o que sugere uma anomalia nas defesas imunitárias, ou possivelmente, na função adrenal (Kelley and Hennekam, 2000).

Considera-se que algumas malformações no SLO e anomalias relacionadas são devidas a uma diminuição dos níveis de colesterol, baixos níveis de esteróis total, ou níveis elevados de precursores de esterol, que por sua vez afectam o desenvolvimento de vários tecidos e órgãos durante a embriogénese. Os precursores de esteróis podem ser bioactivos por si só, ou podem produzir produtos de esteróis bioactivos, como os oxистерóides citotóxicos (Porter, 2006). Outros factores que podem melhorar, ou agravar a severidade do SLO, incluem os que podem aumentar ou diminuir a transferência materno-fetal de colesterol e os que modifiquem a resposta a uma deficiência de esterol (Solca *et al.*, 2007).

Nos defeitos da biossíntese de colesterol, que conduzem a síndromes com malformações, a carência em colesterol provoca baixas concentrações de estriol livre materno, durante a gravidez, incapacidade de desenvolvimento dos órgãos genitais externos nos indivíduos do sexo masculino, devido a uma deficiência na produção de testosterona e atraso mental por hipomielinização no SNC (Clayton, 1998).

Tabela 1.4. Sinais Clínicos da Síndrome Smith-Lemli-Opitz (Adaptado de Salen *et al.*, 1996; Kelley and Hennekam, 2000; Waterham *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2005; Waterham *et al.*, 2006; Porter, 2008).

Caracterização Fenotípica					
Face	Cérebro	Esqueleto	Órgãos	Tracto Gastrointestinal	Outros
Base do nariz larga (++) Cataratas (+) Epicanto (++) Fenda palatina (++) Gengivas espessadas e lábios salientes (++) Hiperpigmentação labial (++) Holoproencefalia (+) Inserção baixa dos pavilhões auriculares (++) Microcefalia (++) Micrognatia/retrognatia (++) Nariz pequeno e narinas antevertidas (++) Pavilhões auriculares rodados posteriormente (+) Pele da nuca redundante (++)	Atraso mental (++) Agenesia do corpo caloso/pelúcido (++) Ausência dos lóbulos frontais (+) Calcificações intracranianas (+) Hipoplasia/Aplasia do cerebelo (+)	Atraso de crescimento intrauterino (+) Defeito nos membros (+) Luxação da anca (++) Micromelia mesomélica (+) Mobilidade articular diminuída (+) Pé varo/valgo (++) Polidactilia pós-axial (++) Sindactilia dos dedos do pé (++)	Ambiguidade genital no sexo masculino (++) Pénis pequeno (++) Criptorquidia/testículos ectópicos (+) Hipospádias (+) Malformações renais (+) Cardiopatia (++) Defeitos no septo atrial e ventricular (+) Fosseta/fístula sagrada (+) Hipertensão (++) Lobo/pulmão ausente/defeito de segmentação (+)	Anomalias intestinais (+) Dificuldades na alimentação no lactente (++) Doença de Hirschsprung/megacólon (+) Estenose do piloro (+)	Alterações de comportamento (+) Anomalias do metabolismo (++) Autismo (+) Convulsões (+) Eczemas na pele (+) Fotossensibilidade (++) Hiperactividade (+) Ptose (+)

Legenda: (+) Sinal frequente; (++) Sinal muito frequente.

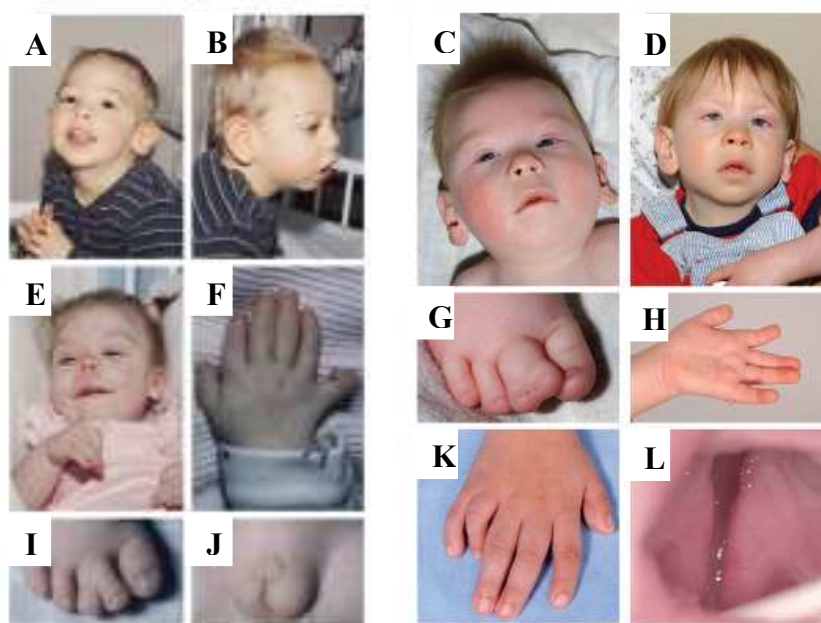


Figura 1.10. Características fenotípicas de SLO. (A-E) Aparência facial incluindo microcefalia, ptose, nariz pequeno virado para cima e micrognatia. (F, H, K) Malformações nas mãos, incluindo polidactilia pós-axial e polegar pequeno. (G e I) Sindactília do segundo e terceiro dedos do pé. (J) Órgão sexual externo ambíguo em paciente 46, XY. (L) Fenda palatina (adaptado de Porter, 2002 e Porter, 2006).

1.6.3. Aspectos bioquímicos

A síndrome SLO caracteriza-se bioquimicamente por baixos níveis de colesterol no plasma e tecidos, concentrações elevadas de 7-DHC e do seu isómero 8-DHC. Para além do 7-DHC e do 8-DHC, também é possível encontrar no plasma de doentes com SLO, um derivado de 7-DHC de 26 carbonos com três duplas ligações localizadas no anel B, identificado como 19-nor-5,7,9(10)-colestatrien-3 β -ol (9-DDHC) (Salen *et al.*, 1996).

A esterol Δ^8 - Δ^7 -isomerase, enzima que converte 7-DHC a 8-DHC, requer aproximadamente 30 minutos para a sua activação, sendo importante quando a conversão de 7-DHC em colesterol está bloqueada. Quando o 7-DHC se acumula nos microsomas do fígado de doentes e não pode ser transformado em colesterol, uma parte deste é convertido a 8-DHC, pela acção de esterol Δ^8 - Δ^7 -isomerase. O 8-DHC formado é quimicamente mais estável que o 7-DHC, mas não é um precursor de colesterol. Tanto o 7-DHC como o 8-DHC são sensíveis ao oxigénio (Salen *et al.*, 1996).

O 7-DHC tem especial importância fisiológica, pois é precursor da vitamina D₃, através da conversão, por acção da luz, de 7-DHC em pré-vitamina D₃, na pele (Kelley and Hennekam, 2000).

Um defeito na biossíntese de colesterol é também suportado pela observação de uma marcada deficiência de ácidos biliares urinários normais, que coincide com a presença de ácidos biliares anormais (Waterham, 2000).

Vários estudos demonstraram que a severidade clínica de SLO se correlaciona melhor com a concentração absoluta ou relativa de colesterol plasmático e com os níveis de 7-DHC e 8-DHC. Isto sugere, em particular, que a disponibilidade de colesterol durante o desenvolvimento do feto é um dos factores determinantes da expressão fenotípica (Waterham, 2000).

Uma concentração baixa de estriol livre materno, combinado com alterações ecográficas, é altamente sugestiva de uma alteração na esteroidogénese. Esta associação explica-se pelo facto de os défices na síntese do colesterol originarem hipocolesterolemia fetal, com diminuição na quantidade de colesterol disponível para a síntese de estriol (que se apresentará baixo), para a construção de membranas celulares, essencial num período de divisão celular intensa e para interagir com as proteínas Sonic Hedgehog, moduladoras da embriogénese e que são activadas pelo colesterol. Pelas mesmas razões, um estriol normal poderá ser encontrado nas formas ligeiras da síndrome (Cardoso *et al.*, 2005).

O fornecimento de colesterol durante a embriogénese pode ser considerado como o factor mais importante que afecta o fenótipo de SLO. O fornecimento de colesterol ao feto em crescimento faz-se por síntese endógena (que está em défice em SLO) e por fontes exógenas – o colesterol é transportado por lipoproteínas da mãe. Diferenças genéticas na mãe, como também no sistema de transporte de esterol para o embrião, podem modificar o fenótipo de SLO. As lipoproteínas que contêm apolipoproteína (Apo) B e receptores de lipoproteína podem desempenhar um papel determinante no fenótipo de SLO (Witsch-Baumgartner *et al.*, 2004).

1.6.3.1. Concentração de esteróis no plasma

Num estudo feito em 50 doentes com SLO, os valores médios \pm desvio padrão (SD) de colesterol, 7- DHC e 8-DHC foram 49 ± 41 mg/dl, 16 ± 10 mg/dl e 12 ± 5 mg/dl, respectivamente. A concentração de colesterol, em 47 desses doentes, foi menor que 110 mg/dl, enquanto que em 95% das crianças com idades compreendidas entre os 2-5 anos de idade, os valores de colesterol considerados normais são superiores a 120 mg/dl (tabela 1.5.). A concentração de 7-DHC em crianças e adultos saudáveis varia entre 0.005 a 0.01 mg/dl,

enquanto o isómero 8-DHC normalmente não é encontrado (Salen *et al.*, 1996). Axelson (1991), num estudo sobre o doseamento dos isómeros dehidrocolesterol, afirmou que o plasma humano contém pequenas quantidades de três tipos de colestadien-3 β -ol: o 7-DHC, o 8-DHC e um composto identificado como colest-5,8(9)-dien-3 β -ol e que os seus valores, em indivíduos normais, nunca eram superiores a 0.005% do colesterol plasmático. Estabeleceu valores de referência, numa população normal, para o 7-DHC + 8-DHC de 0.12 μ g/ml. Tint *et al.*, descreveu aproximadamente níveis elevados, 1000 a 5000 vezes mais, para os três tipos de colestadien-3 β -ol no plasma de vários doentes SLO, assim como níveis baixos para o colesterol (Kelley, 1995).

Num estudo de Kelley (1995), em plasmas de 35 doentes SLO, os valores médios \pm SD de colesterol foram de 565 ± 533 μ g/ml e para o 7-DHC de 148 ± 119 μ g/ml. Neste estudo, para além dos níveis baixos de colesterol no plasma, foram encontrados níveis elevados de 7-DHC, latosterol, colest-8(14)-en-3 β -ol e 7-dehidrodesmosterol, nos doentes SLO (Kelley, 1995).

Nissinen *et al.* (2000) quantificou vários esteróis em soros de controlos, doentes SLO com fenótipo moderado e um caso de fenótipo severo (ver tabela 1.5.) (Nissinen *et al.*, 2000).

Hass *et al.* (2005) estabeleceu valores de referência para o 7-DHC, 8-DHC e colesterol numa população normal e comparou um caso clínico de um doente SLO com um grupo de doentes SLO severamente afectados. O caso clínico descrito apresentava níveis de colesterol inferiores aos normais e níveis de 7-DHC e o 8-DHC superiores aos normais. No entanto, tanto os níveis de 7-DHC, 8-DHC e colesterol assim como a razão (7-DHC + 8-DHC)/colesterol são inferiores no caso clínico com fenótipo clássico de SLO do que no grupo de doentes SLO com fenótipo severo (Hass *et al.*, 2005).

Tabela 1.5. Níveis de colesterol, 7-DHC, 8-DHC e outros esteróis no plasma de doentes SLO e grupos controlo (Kelley, 1995; Salen *et al.*, 1996; Nissinen *et al.*, 2000 e Hass *et al.*, 2005).

Referência	Esteróis	Doentes SLO	SLO	SLO	Grupo Controlo	
		n = 50	Tipo I n = 36	Tipo II n = 14		n = 14
mg/dl (media ± SD)						
Salen <i>et al.</i> , 1996	Colesterol	49 ± 41 [3.7 – 190]	65 ± 38 ^a [18 – 190]	9.4 ± 6.5 [3.7 – 29]	143 ± 20 [109 – 176]	
	7-DHC	16 ± 10 [0.15 – 61]	14 ± 7 ^b [0.15 – 30]	20 ± 14 [6 – 61]	nd	
	8-DHC	12 ± 5 [1 – 26]	11 ± 4 ^b [1 – 19]	15 ± 7 [7 – 26]	nd	
	Esteróis Total	79 ± 37 [22 – 200]	91 ± 34 ^a [32 – 200]	48 ± 25 [22 – 104]	143 ± 20 [143 ± 20]	
	Idade (anos)	7.2 ± 9.9 [1d – 3.5a]	9.9 ± 11 [1d – 3.5a]	0.26 ± 0.66 [1d – 2.5a]	2 ± 2	
Kelley, 1995		Doentes SLO	Grupo Controlo 1	Grupo Controlo 2		
		n = 35	n = 52	n = 11		
	µg/ml (media ± SD)					
	Colesterol	565 ± 533 [59 – 1790]	1545 ± 560 [429 – 2743]	2172 ± 445 [1656 – 2846]		
7-DHC	148 ± 119 [2.70 – 470]	0.10 ± 0.05 [0.02 – 0.29]	0.13 ± 0.04 [0.07 – 0.16]			
Idade (anos)	-	1d – 12a	12a – adulto			
Nissinen <i>et al.</i> , 2000		SLO fenótipo moderado	SLO fenótipo severo	Grupo Controlo		
		n = 7	n = 1	n = 124		
	µmol/L (media ± SD) (excepto o colesterol)					
	Colesterol (mmol/L)	4.08 ± 0.33 ^c [3.75 – 4.41]	0.51	6.12 ± 0.55 [5.57 – 6.67]		
	7-DHC	50.75 ± 18.9 ^c [31.78 – 69.72]	302.63	0.14 [0.10 – 0.20]		
	8-DHC	9.84 ± 1.67 ^d [8.17 – 11.51]	157.29	0.18 [0.14 – 0.23]		
	Esqualeno	1.55 ± 0.24 [1.31 – 1.79]	10.56	2.03 ± 0.19 [1.84 – 2.22]		
Latosterol	13.27 ± 3.54 [9.73 – 16.81]	8.87	12.38 ± 1.08 [11.30 – 13.46]			
Colestanol	4.26 ± 0.54 ^d [3.72 – 4.80]	19.30	8.82 ± 0.76 [8.06 – 9.58]			

	Campesterol	13.46 ± 3.11 [10.35 – 16.57]	1.55	12.06 ± 1.08 [10.98 – 13.14]
	β-Sitosterol	7.21 ± 1.18 [6.03 – 8.39]	0.40	7.75 ± 0.70 [7.05 – 8.45]
	Idade (anos)	-	-	-
		SLO n = 1	SLO com fenótipo severo	Grupo Controlo n = 105
		mg/dL (media ± 2SD)		
Hass <i>et al.</i> , 2005	Colesterol	96	21.7	140 ± 105 [35 – 245]
	7-DHC	0.219	12.9	0.038 ± 0.073 [0.008 – 0.11]
	8-DHC	0.303	14.1	0.031 ± 0.077 [0.001 – 0.10]
	[7-DHC + 8-DHC] Colesterol	0.0054	1.244	0.00058 ± 0.00090 [0.00054 – 0.00148]
	Idade (anos)	-	-	-

Legenda: Abreviaturas: d, dia; a, ano; nd, nada detectado. ^aP < 0.001 versus Tipo II. ^bP < 0.05 versus Tipo I. ^cP < 0.01 quando comparado com os valores de referência do grupo controlo. ^dP < 0.001 quando comparado com os valores de referência do grupo controlo.

Nota: A conversão de mg/dl para μmol/L é feita dividindo por 10 e multiplicando pelo peso molecular do respectivo composto. A conversão de μg/ml para μmol/L (μM) é feita multiplicando pelo peso molecular do respectivo composto e dividindo por 1000. A conversão de mmol/L para μmol/L é feita multiplicando por 1000.

É de notar que a proporção de colesterol, 7-DHC e 8-DHC em tecidos, reflecte as suas percentagens no plasma. Esta distribuição sugere que, embora o defeito na enzima seja expresso em todos os tecidos, a maioria do colesterol é sintetizado no fígado e que os esteróis nos tecidos provêm das lipoproteínas plasmáticas, que são formadas neste órgão. A excepção é o cérebro, onde a biossíntese de colesterol durante a vida fetal é muito activa, pelo que, a composição de esteróis no cérebro é bastante baixa em doentes com SLO. Além disso, porque a barreira hemato-encefálica impede que os esteróis no plasma passem para as reservas no cérebro, a composição de esteróis no cérebro é pouco influenciada pela sua concentração no sangue circulante, que, por sua vez, pode ser enriquecido pela absorção de colesterol proveniente da dieta. Num estudo de um feto de 20 semanas com SLO tipo II, que morreu rapidamente após o nascimento, observou-se que a diferença na composição de esteróis no cérebro e outros tecidos é bastante acentuada: a concentração post-mortem de colesterol nos

tecidos era de 20% e os 72% correspondiam à mistura de 7-DHC e 8-DHC (tabela 1.6.). Os níveis de esteróis no cérebro eram 4.1% de colesterol e 92% da mistura 7-DHC e 8-DHC, o que demonstra que o cérebro é mais vulnerável a um defeito na biossíntese de colesterol; desta forma, medições dos níveis de esteróis no plasma podem não reflectir completamente a verdadeira privação de colesterol e a acumulação de precursores 7-DHC e 8-DHC no SNC (Salen *et al.*, 1996).

O 8-DHC pode acumular nos tecidos porque é quimicamente mais estável que o 7-DHC (Salen *et al.*, 1996).

Tabela 1.6. Tabela sobre a composição de esteróis nos diversos órgãos de um feto com 20 semanas (adaptada de Salen *et al.*, 1996).

Amostra	Total mg/g	Colesterol	7-DHC %	8-DHC
Diversos órgãos (*)	4.2 ± 1.1 [3.1 – 5.3]	20 ± 2 [18 – 22]	37 ± 5 [32 – 42]	35 ± 5 [30 – 40]
Cérebro	5.1	4.1	61	31

Legenda: (*) corresponde ao fígado, glândula adrenal, músculo, pulmões, rim, tecido adiposo e timo.

Como o mesmo defeito enzimático é responsável pelo fenótipo Tipo I e pelo fenótipo, clinicamente mais severo Tipo II, as anomalias bioquímicas são mais severas num plasma de um doente SLO Tipo II, onde se observa acentuadamente uma maior deficiência de colesterol e níveis mais elevados de 7-DHC e 8-DHC. Doentes com SLO têm normalmente, baixos níveis de colesterol no plasma e invariavelmente têm elevados níveis de precursores de colesterol, como o 7- DHC, o 8- DHC e ausência de desmosterol (Yu and Patel, 2005).

Vários doentes com sintomas muito leves foram identificados com um nível de colesterol “border-line” e concentrações vestigiais de 7-DHC e 8-DHC, reflectindo uma redução da actividade de DHCR7 de aproximadamente 20% a 50% do normal (Waterham, 2000).

Todos os doentes com SLO com níveis de colesterol inferiores a 10 mg/dl tiveram morte neonatal, ou nos primeiros meses de vida. A morte é causada sobretudo pelas malformações internas congénitas e não pelas consequências bioquímicas, devidas aos níveis de esteróis anormais (Kelley and Hennekam, 2000).

Sendo o SLO uma patologia de transmissão autossómica recessiva, os pais dos doentes com SLO são assintomáticos. No entanto, metade dos pais tem níveis de 7-DHC ligeiramente aumentados no plasma. Não há nenhuma consequência clínica adversa deste facto (Kelley and Hennekam, 2000).

1.6.3.2. Esteróis fecais e biliares e ácidos biliares

Tanto o 7-DHC como o 8-DHC são excretados na biliar e também aparecem nas fezes, associados a pouco colesterol. Como consequência de uma marcada redução na biossíntese de colesterol e de uma depleção de colesterol hepático, a síntese de ácidos biliares é reduzida e nenhum ácido biliar é detectado nas fezes de uma criança com um fenótipo Tipo II. Quando esta criança é sujeita a uma dieta rica em colesterol durante várias semanas, os ácidos biliares apareceram na biliar e nas fezes, o que indica que é a carência de colesterol a responsável pela ausência de síntese de ácidos biliares (Salen *et al.*, 1996).

Num estudo de Natowicz e Evans, foi observada uma excreção anormal de ácidos biliares na urina de doentes SLO (Salen *et al.*, 1996).

Como os ácidos biliares também são sintetizados a partir do colesterol, a sua deficiência acarreta uma incapacidade na absorção de colesterol da dieta, o que provoca deficiência em vitaminas liposolúveis. Por sua vez, quando o colesterol é suficiente para ser convertido em sais biliares pelo fígado, a absorção de colesterol da dieta é restabelecida (Yu and Patel, 2005).

Na urina de uma mulher grávida de um feto SLO, os principais esteróis excretados são o 16 α -OH-17 β -dihidroequilina e 16 α -OH-17 β -dihidroequilina (Moebius *et al.*, 2000).

1.6.3.3. Esteróis no líquido amniótico

Vários estudos indicam que o diagnóstico pré-natal para SLO pode ser realizado bioquimicamente através da quantificação de 7-DHC no líquido amniótico (LA). Num estudo de Kratz e Kelley (1999), os níveis de 7-DHC no LA encontravam-se aumentados em 19 fetos com SLO, quando comparados com controlos normais (em doentes SLO [4.68 – 33.28 μ mol/l] e controlos [0.0022 – 0.0178 μ mol/l]). A razão 7-DHC/esteróis totais também se encontrava elevada (fetos SLO 26.8 \pm 9.3%; fetos normais 0.02 \pm 0.02%) (Kratz and Kelley, 1999). Tint *et al.* (1998) determinou, em 7 gravidezes afectadas com SLO, que a concentração de 7-DHC encontrava-se 20 a 250 vezes superior às gravidezes normais (Tint *et al.*, 1998).

Em 6 LA de grávidas com diagnóstico clínico confirmado para SLO e de 15, 16, 17, 19, 31 e 36 semanas de gestação foram encontrados níveis elevados de 7-DHC (doentes SLO [7.28 – 25.48 $\mu\text{mol/l}$] e normais [0.0108 – 0.212 $\mu\text{mol/l}$]). Estes líquidos também apresentavam níveis elevados de latosterol (Kelley, 1995). O isómero de 7-DHC, 8-DHC, também pode ser detectado no LA de fetos afectados, embora a sua concentração seja inferior à do 7-DHC (Tint *et al.*, 1998). A concentração de colesterol no LA de fetos SLO tende a ser mais baixa que nas gestações normais, mas a diferença não é estatisticamente significativa (Salen *et al.*, 1996; Irons and Tint, 1998; Kratz and Kelley, 1999). Os níveis de latosterol e os níveis da fracção de latosterol em relação aos esteróis totais, também se encontram aumentados em fetos SLO (Kratz and Kelley, 1999).

A presença de colesterol e latosterol é constante em LA de fetos normais, enquanto por sua vez, o 7- e 8-dehidrocolesterol são virtualmente ausentes (Chevy *et al.* 2005).

Doentes com SLO podem ser diagnosticados através de um teste pré-natal, pela detecção de quantidades aumentadas de 7-DHC no LA colhido após as 16 semanas de gravidez (Salen *et al.*, 1996).

1.6.3.4. Hormonas esteróides

Um dos indicadores bioquímicos mais precoces de um feto com SLO é a concentração baixa de estriol não conjugado no soro materno (μE3) (Salen *et al.*, 1996). A síntese de μE3 (hormona esteróide relacionada com a gravidez) depende do colesterol produzido pelos tecidos do feto. Níveis baixos a indetectáveis de μE3 observam-se na urina, líquido amniótico e soro de mulheres grávidas de fetos afectados com SLO. Além disso, a utilização de precursores esteróis pelas glândulas supra-renais e gónadas fetais conduz a uma síntese anormal de estrogénios, que passam para o sangue da gestante e são excretados na urina materna (Yu and Patel, 2005). Os níveis de gonadotrofina coriónica e de α -fetoproteína, também se encontram baixos nas gravidezes de SLO (Salen *et al.*, 1996).

A incapacidade de sintetizar colesterol provoca uma insuficiência adrenal e um défice na síntese de esteróides adrenais (Yu and Patel, 2005). Em crianças com SLO, uma deficiência suave a moderada da síntese de aldosterona, provoca hiponatremia ou hipercaliémia, durante um stress hormonal, devido a uma infecção (Kelley and Hennekam, 2000).

Em alguns casos de SLO observa-se uma masculinização incompleta dos órgãos genitais externos, que pode ser causada por uma diminuição da síntese de testosterona *in útero* (Danzer *et al.*, 2000).

1.6.3.5. 7-Dehidrocolesterol e vitamina D

Uma vez que, na pele, o 7-DHC é um precursor para síntese de vitamina D, níveis elevados de 7-DHC em doentes com SLO podem diminuir o risco de raquitismo (Porter, 2002).

Quando os níveis de vitamina D no soro são elevados, a homeostase do cálcio pode ser alterada (Porter, 2002).

1.6.3.6. Efeito nas Apolipoproteínas

A apolipoproteína E (ApoE) é um ligando envolvido no transporte de colesterol e um ligando a receptores de lipoproteínas, que medeiam a captação de colesterol nas várias células e tecidos e, participa em processos tão distintos, como a activação de linfócitos e homeostase de colesterol nos macrófagos. As isoformas de ApoE diferem na afinidade de ligação a receptores de lipoproteínas e têm um efeito profundo na concentração de colesterol sérico. A Apo E humana é um dos determinantes genéticos para a concentração de colesterol total sérico e para a LDL-colesterol, e desempenha papéis fundamentais na *clearance* das lipoproteínas e na absorção intestinal de colesterol (Witsch-Baumgartner *et al.*, 2004).

A ApoE faz parte do sistema de transporte de colesterol materno-embrionário. No contexto de uma limitada síntese endógena de colesterol, a ApoE torna-se um componente crítico para o fornecimento embrionário de colesterol e sua homeostase (Witsch-Baumgartner *et al.*, 2004).

Uma variação genética no locus da Apo E é um modificador da severidade fenotípica do SLO nos fetos. Embriões com SLO, que recebem menos colesterol da mãe, são severamente afectados e apresentam níveis de colesterol pós-natal muito baixos. Um genótipo materno de ApoE, que resulte num baixo fornecimento de colesterol ao embrião, pode provocar malformações severas (Witsch-Baumgartner *et al.*, 2004).

O genótipo de ApoE2 materno, foi associado a um fenótipo de SLO severo, considerando que o genótipo de ApoE sem o alelo de E2 está associado a um fenótipo mais moderado (Witsch-Baumgartner *et al.*, 2004).

1.6.3.7. Outras causas para o aumento de 7-DHC

O 7-DHC existe em pequena quantidade nos tecidos humanos, numa percentagem relativamente constante em relação ao colesterol. Na hipercolesterolemia, os níveis absolutos de 7-DHC podem estar aumentados, mas a sua concentração relativa ao colesterol é mantida. Noutras condições, onde há uma alteração do metabolismo do colesterol, como a Xantomatose Cerebrotendinosa (CTX) (ver anexo B), os níveis de 7-DHC podem estar aumentados 10 a 20 vezes, mas a presença de colestanol permite estabelecer um diagnóstico correcto (Kelley and Hennekam, 2000).

Outra causa de níveis aumentados de 7-DHC é o tratamento com haloperidol, o qual tem uma elevada afinidade para o local de ligação ao substrato da DHCR7. Esta enzima é um membro da classe “sigma” de proteínas de ligação a drogas. É provável que outras drogas desta classe causem níveis aumentados de 7-DHC por inibição da DHCR7. Tais drogas, podem ter efeitos particularmente adversos em doentes com SLO, que por si só já tem uma marcada diminuição da actividade enzimática (Kelley and Hennekam, 2000).

1.6.3.8. Consequências das alterações bioquímicas

Alguns dos precursores de colesterol são biologicamente activos e alterações nas suas concentrações podem provocar consequências funcionais. Concentrações baixas de colesterol, ou a sua substituição por outro esterol, podem causar efeitos nefastos durante o desenvolvimento. Em particular, a acumulação de 7-DHC e 8-DHC em doentes com SLO pode levar à síntese de ácidos biliares e hormonas esteróides anómalos (Porter, 2002). Além disso, os oxisteróides, que são potentes inibidores da biossíntese de esteróis e de outros processos celulares, podem ser sintetizados a partir de intermediários de esteróis anormais (Moebius *et al.*, 2000).

O 7-DHC pode também prejudicar a função das proteínas com domínios sensíveis ao esterol, como a HMGR e a proteína Niemann-Pick tipo C (NPC1) entre outras.

Uma função importante dos intermediários esteróis é a regulação por feedback da via de biossíntese do colesterol. O 7-DHC inibe a biossíntese de colesterol mais eficazmente que o próprio colesterol. Fitzky *et al.* (2001), demonstrou que o 7-DHC inibe a síntese de colesterol, acelerando a degradação da proteína HMGR e o grupo de Wassif (2002), demonstrou que o 7-DHC prejudica o metabolismo das LDL-colesterol, uma vez que a sua acumulação nos fibroblastos diminui o transporte de colesterol intracelular.

Para além do papel como molécula precursora, o colesterol é um lípido estrutural das membranas celulares. Uma alteração na taxa de 7-DHC/colesterol pode também afectar interacções celulares e a morfologia durante o desenvolvimento, devido a uma perturbação na transdução de sinal dos grupos de lípidos que formam ilhotas nas membranas. Logo, a incorporação de 7-DHC, por substituição do colesterol, altera as propriedades estruturais dos grupos de lípidos que formam ilhotas nas membranas, o que pode afectar a estrutura das proteínas locais, ou as interacções (Porter, 2002). A formação de grupos de lípidos nas ilhotas das membranas é altamente dependente da estrutura do componente esterol. O 7-DHC é significativamente “mais forte do que o colesterol”, na promoção da formação de tais ilhotas. Assim, tanto os níveis de esteróis totais como a composição destes podem ter efeitos na formação e/ou no funcionamento das ilhotas de lípidos. Nos doentes com defeitos na biossíntese de colesterol, a formação de ilhotas e/ou a localização de domínios de sinalização Hedgehog, modificados por esterol, está alterado o que conduz a um defeito na sinalização Hedgehog (Waterham, 2006).

Dehart *et al.* (1997), demonstrou que uma redução de colesterol na membrana conduz a um aumento da sua fluidez, em células afectadas, e à redução da adesão entre as células, efeitos que podem ser responsáveis por uma organogénese anormal. Tulenko *et al.* (2006) demonstrou que as membranas de doentes SLO têm um aumento da fluidez membranar e que a substituição de colesterol por 7-DHC provoca uma organização membranar atípica (Porter, 2008).

A exocitose é um mecanismo de secreção de hormonas, de enzimas, de neuropeptídeos e de neurotransmissores para tecidos ou células vizinhas. Na formação controlada de vesículas secretórias, em animais com erros inatos na síntese de colesterol, o colesterol não pode ser substituído por outros lípidos com semelhança estrutural. Quando o colesterol é incorporado nas membranas, o anel esterol interage com grupos de fosfolípidos para proporcionar a fluidez necessária e a curvatura característica que permite a formação de vesículas. Quando esteróis diferentes de colesterol estão presentes, a integridade da membrana está comprometida e isto provoca a ausência ou malformação de vesículas secretórias. Logo, a formação de grânulos, quer em tecidos exócrinos como endócrinos, é afectada por uma deficiência em colesterol, o que provavelmente responde a múltiplos défices fisiológicos observados em doentes SLO (Gondré-Lewis *et al.*, 2006).

A substituição de colesterol por 7-DHC nas membranas dos doentes com SLO, explica a anormal formação de grânulos secretórios (Porter, 2008).

Perturbações na estrutura da membrana provocam defeitos funcionais nas células com receptores IgE, na produção de citocinas, na função dos receptores de NMDA e serotonina (Porter, 2008). Uma possível vantagem para os portadores de SLO é a protecção relativa de aterosclerose, devido a baixos níveis de colesterol no sangue, tal como um baixo risco para as crianças em adquirir raquitismo, devido a um aumento da produção de vitamina D, como consequência do elevado nível 7-DHC (Waterham, 2000).

Uma vez que muitos vírus dependem de um evento de fusão da membrana para infectar células, é plausível que a presença de níveis vestigiais de 7-DHC na membrana plasmática de portadores, possa proteger o hospedeiro de algumas doenças virais, uma possibilidade que tem sido testada em modelos animais e células humanas (Porter, 2002).

1.6.4. Aspectos moleculares

1.6.4.1 Gene *DHCR7*

O gene *DHCR7*, codificante da enzima 7-dehidrocolesterol reductase, foi primeiramente clonado, não como gene de uma enzima do metabolismo de colesterol, mas como um gene candidato de uma proteína de ligação a drogas (Kelley and Hennekam, 2000).

O gene humano *DHCR7* está situado no cromossoma 11q12-13, abrange 14.100 pares de base (bp) do DNA genómico e é constituído por oito intrões e nove exões que variam de tamanho, desde 64 bp (exão 1) até 465 bp (exão 9) (Correa-Cerro and Porter, 2005). Os primeiros dois exões são não codificantes (Waterham, 2000).

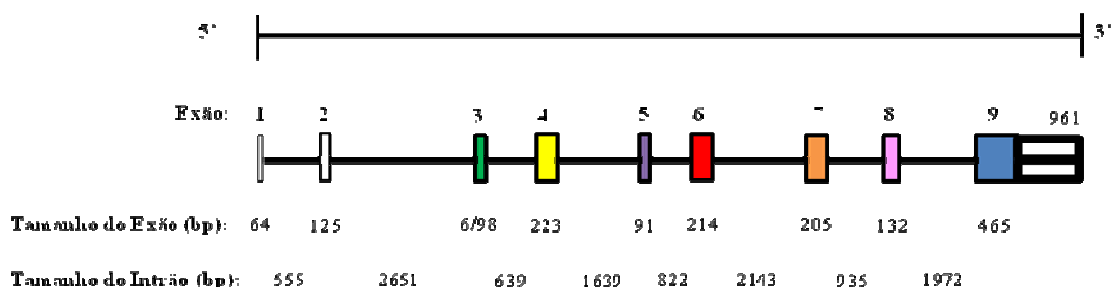


Figura 1.11. Estrutura genómica de *DHCR7* humano. Nesta figura, os exões são indicados através de caixas. As regiões codificantes estão assinaladas com caixa às cores e as regiões não codificantes estão assinaladas com caixas brancas (exão 1 e 2) (adaptado de Correa-Cerro and Porter, 2005).

A análise por Northern Blot revelou a ocorrência de dois mRNAs de *DHCR7* diferentes (aproximadamente 2.9 e 2.3 kb), que variam no comprimento da região não codificante do terminal 3' (codificada através do exão 9), de acordo com a presença de dois locais putativos de poliadenilação (Waterham, 2000).

O mRNA de *DHCR7* tem uma extensão de 2786 bp e tem uma grelha de leitura de 1425 bp, que codifica, um polipéptido de 475 aminoácidos com uma massa molecular calculada de 54.5 kDa (Waterham, 2000). A grelha de leitura de *DHCR7* é codificada pelos exões três a nove. A região terminal 5' não traduzida do *DHCR7*, com 194 bp, é codificada pelos exões um, dois e parte do três. O codão de iniciação da tradução está localizado no exão três. O exão nove codifica o terminal carboxilo da proteína de *DHCR7* e a região não traduzida do terminal 3', com 961bp (Correa-Cerro and Porter, 2005).

A expressão do mRNA de *DHCR7* é ubíqua, tanto nos tecidos dos adultos, como nos do feto, com níveis mais altos na glândula adrenal (adulto), no fígado e, em menor extensão, no cérebro (Waterham, 2000).

A expressão de *DHCR7* é induzida por privação de esterol. O local de início da transcrição no 179 bp em 5', é necessário para iniciar a transcrição regulada do esterol (Correa-Cerro and Porter, 2005).

1.6.4.2. Mutações no gene *DHCR7*

Mutações no gene *DHCR7* causam SLO. Numa revisão de 599 mutações *DHCR7* publicadas, foram identificados 105 alelos mutantes diferentes. O espectro mutacional de SLO consiste, tal como sucede com a maioria das doenças autossómicas recessivas em: mutações missense que correspondem à vasta maioria de mutações descritas (87.6% do espectro total); e mutações nulas menos frequentes (por exemplo, mutações nonsense, defeitos de “splicing”, inserções e deleções) (Correa-Cerro and Porter, 2005; Yu and Patel, 2005).

Presentemente, estão descritas um total de 130 mutações (685 alelos) no gene *DHCR7* (Porter, 2008). As mutações estão localizadas ao longo da região codificante (exões 3 – 9), incluindo 105 missense, cinco nonsense, três defeitos no splicing e oito inserções de nucleótidos ou deleções. Cinquenta por cento das mutações missense estão localizadas num dos nove domínios transmembranares previstos (Yu and Patel, 2005).

As doze mutações mais frequentes no gene *DHCR7* e que correspondem a 69,2% das mutações descritas são: IVS8-1G>C (28,2%), T93M (10,4%), W151X (6,0%), R404C (5,2%),

V326L (5,0%), R352W e E448K (ambas 3,2%), G410S (2,2%) e R242H (1,0%) (Correa-Cerro and Porter, 2005; Porter, 2008). A IVS8-1G>C é a mutação mais frequentemente no gene *DHCR7*, é uma mutação nula e por conseguinte os doentes homozigóticos para este alelo são severamente afectados. A mutação T93M (278C>T), é a segunda mais frequente e está associada a um fenótipo de SLO moderado, no entanto, têm sido identificados alguns doentes com esta mutação severamente afectados (Correa-Cerro and Porter, 2005).

Num estudo efectuado em doentes portugueses, foram identificadas sete mutações distintas, três das quais são novas (F174S, H301R e Q98X). As mutações comuns IVS8-1G>C e T93M juntamente com H301R, correspondem a 70% de todos os alelos para SLO na população Portuguesa (Cardoso *et al.*, 2005).

Além das mutações que causam a doença, vários polimorfismos foram descritos no gene de *DHCR7*, alguns dos quais mais comuns que os outros (Waterham, 2000).

1.6.4.3. Heterogeneidade do fenótipo e factores que o afectam

O paradigma clássico para a patogénese de um erro inato do metabolismo inclui a acumulação de um precursor tóxico e/ou uma deficiência de um produto essencial, como resultado de uma deficiência enzimática. No caso de SLO, a acumulação de precursores de colesterol, como o 7-DHC, potencialmente tóxico (embora ainda não tenha sido demonstrado de forma convincente) e a deficiência de colesterol, é prejudicial, embora, o modo como a sua carência conduz à dismorfologia ainda não está bem elucidado (Yu and Patel, 2005).

Apesar de a severidade do fenótipo parecer correlacionar-se inversamente com os níveis de colesterol no sangue e com a actividade da *DHCR7*, existe, contudo, uma heterogeneidade de fenótipo considerável nos doentes com mutações *DHCR7* idênticas. O espectro fenotípico de SLO é muito variável, desde a não viabilidade embrionária a níveis diversos de severidade pós-natal, incluindo dismorfia facial, atraso mental, comportamento autista, hipotonia, dificuldades na alimentação e anomalias estruturais variáveis no coração, pulmões, cérebro, tracto gastrointestinal, membros, zonas genitais e rins. Outros factores, além do genótipo e dos níveis de colesterol e/ou de 7-DHC, podem influenciar a severidade clínica, os quais incluem: (i) factores maternos (que afectam o fornecimento de colesterol ao feto em desenvolvimento); (ii) as quantidades de colesterol que o feto pode acumular nos tecidos do sistema nervoso antes da barreira hemato-encefálica se formar; (iii) a velocidade à qual os precursores potencialmente tóxicos se acumulam ou são removidos dos tecidos fetais;

e (iv) outros factores genéticos e epigenéticos não definidos (Yu and Patel, 2005; Porter, 2002).

1.6.5. Síndrome Smith-Lemli-Opitz e Sistema Nervoso Central

Nos doentes SLO, um fenótipo com atraso mental e alterações no comportamento, pode ser devido a (i) anormalidades no desenvolvimento, ou a (ii) uma perturbação no funcionamento do SNC, devido ao défice de colesterol no tecido (Porter, 2002).

Níveis diminuídos de colesterol contribuem para anormalidades serotoninérgicas nestas desordens. Crianças e adultos com SLO têm frequentemente depressão clínica, impulsividade e comportamentos de agressão, o que é consistente com uma função serotoninérgica alterada. A via de sinalização Hedgehog, está envolvida na produção de neurónios serotoninérgicos num cérebro em desenvolvimento. Em SLO, os níveis de esteróis anormais durante o desenvolvimento, perturbam o funcionamento normal desta via (Porter, 2002).

Um tratamento com uma dieta de colesterol pode ajudar a prevenir o desenvolvimento de um comportamento autista em doentes SLO. Uma vez que a barreira hemato-encefálica exclui significativamente a transferência de colesterol proveniente da dieta para o SNC, os efeitos benéficos do tratamento podem ser mediados por neuroesteróides, moléculas que modulam a actividade de vários receptores de neurotransmissores, incluindo glutamato NMDA, GABA e receptores colinérgicos (Porter, 2002).

Uma síntese de colesterol diminuída nas células da glia, pode alterar uma normal sinaptogénese. Desta forma, um fenótipo clínico, especialmente atraso mental, pode ser o resultado da ausência de colesterol durante a sinaptogénese. A substituição de colesterol e desmosterol por 7-DHC e 7-dehidrodesmosterol, respectivamente, pode inibir directamente o receptor NMDA ou prejudicar a deslocação de receptores para a membrana sináptica. A função de NMDA pode também ser prejudicada, indirectamente por um efeito no funcionamento dos neuroesteróides, uma vez que a função dos receptores glutamato NMDA aumenta com os neuroesteróides, e níveis diminuídos de colesterol reduzem a produção de neuroesteróides. O aumento nos níveis de 7-DHC também pode inibir a formação de neuroesteróides ou conduzir a síntese de um análogo inibitório (Porter, 2002).

Estudos neurofisiológicos, indicam que uma alteração no metabolismo de colesterol em ratinhos *Dhcr7^{-/-}*, pode afectar uma resposta do glutamato, por acção directa nas

membranas celulares ou indirectamente através de efeitos na síntese ou função de neuroesteróides do cérebro. Nos ratinhos Dhcr7^{-/-}, que apresentavam uma anormal sucção e problemas na alimentação, testes neurofisiológicos demonstraram uma diminuição na resposta de receptores NMDA e a excitação de glutamato nos neurónios corticais (Herman, 2003).

1.6.6. Métodos de diagnóstico pré-natal da síndrome de Smith-Lemli-Opitz

O primeiro diagnóstico pré-natal de SLO foi descrito por Abuelo *et al.* (1995).

Na suspeita precoce de um caso de SLO, a ecografia constitui um exame importante, permitindo detectar alterações ainda durante a vida fetal. De acordo com um trabalho recente de análise retrospectiva de 30 casos, as manifestações antenatais desta patologia incluem: (i) no primeiro trimestre, aumento da translucência da nuca em cerca de 26% dos casos; (ii) no segundo trimestre (entre as 20 e 22 semanas), edema da nuca (26%), malformações renais (26%), polidactilia (10%), ambiguidade sexual (6%), malformações cerebrais (10%), malformações cardíacas (10%) e atraso de crescimento intra-uterino (ACIU) (20%); e (iii) na ecografia de terceiro trimestre (30 - 34 semanas), ACIU em 46% dos casos, pelo que este constitui a manifestação ante-natal mais frequente de SLO identificada. Só em 6% dos casos referidos foi possível detectar um conjunto de cinco anomalias e, em 16% dos casos todas as ecografias efectuadas foram consideradas normais. Estes dados, demonstram que o diagnóstico ecográfico é por si só insuficiente e que, por vezes, as malformações presentes são subtis, não sendo detectadas no período pré-natal (Cardoso *et al.*, 2005). Em alguns casos de fetos afectados com SLO, a ecografia é normal, o que invalida o seu uso como diagnóstico definitivo para a patologia (Irons and Tint, 1998).

Outra das possibilidades de rastreio pré-natal é a determinação de baixos a indetectáveis níveis de estriol não conjugado no soro materno e líquido amniótico (LA) de grávidas e fetos afectados com SLO (Irons and Tint, 1998). Um valor baixo de estriol livre na mãe, combinado com as alterações ecográficas no feto, é altamente sugestivo de uma alteração na esteroidogénese. Esta associação explica-se pelo facto de os défices na síntese do colesterol originarem hipocolesterolemia fetal, com diminuição na quantidade de colesterol disponível para a síntese de estriol, para a construção de membranas celulares e para interagir com as proteínas Sonic Hedgehog, moduladoras da embriogénese. Pelas mesmas razões, um estriol normal poderá ser encontrado nas formas ligeiras da síndrome. Isoladamente, os níveis baixos de estriol livre não constituem um bom indicador na selecção de casos para

diagnóstico pré-natal de SLO, uma vez que, ainda não é bem conhecida a proporção de gravidezes com esta alteração e, que pode ser atribuída a gravidezes SLO, pois existem outras causas mais frequentes, às quais se pode imputar essa situação, nomeadamente: morte fetal, anencefalia, hipoplasia congénita das supra-renais e défice em sulfatase dos esteróides entre outras (Cardoso *et al.*, 2005 e Irons and Tint, 1998).

Apesar dos possíveis rastreios pré-natal, por ecografia ou por alteração anormal no soro materno, poderem identificar fetos em risco de SLO, o diagnóstico definitivo é apenas possível por análise de esteróis no LA e células coriônicas (Irons and Tint, 1998). Na maioria dos casos, a análise por cromatografia de fase gasosa com espectrometria de massa (GC-MS), em modo de ião selectivo, dos níveis de esteróis no plasma, soro e LA é um método altamente específico e seguro para o diagnóstico bioquímico de SLO. No entanto, análises adicionais podem ser exigidas para um diagnóstico definitivo. Estas podem ser feitas através do doseamento da actividade enzimática da DHCR7, que pode ser executado numa grande variedade de tecidos e células (por exemplo, vilosidades coriônicas, cultura de amniócitos e fibroblastos da pele) e/ou por análise mutacional do gene *DHCR7* (Waterham, 2000).

A actividade enzimática da DHCR7 tem sido determinada pela análise de conversão do 7-DHC com marcação isotópica ou pelo seu precursor imediato, o latosterol. Neste ensaio, o latosterol precisa de ser primeiro metabolizado para se tornar no substrato para DHCR7. Uma alternativa, que evita os problemas causados pela instabilidade e disponibilidade dos precursores marcados radioactivamente, é o uso de ergosterol como substrato para DHCR7. Embora menos sensível que os ensaios baseados nos isótopos, o ensaio de conversão de ergosterol através da detecção por GC-MS dos esteróis produzidos, é actualmente o método mais usado para analisar a actividade enzimática da DHCR7 em células ou tecidos de doentes com SLO (Waterham, 2000).

Com a clonagem e localização cromossómica do gene *DHCR7* em 11q12-13, ficou a conhecer-se o espectro mutacional responsável pelo SLO em diferentes populações e tornou-se possível o diagnóstico molecular de SLO, com base na identificação de mutações no gene *DHCR7* (Cardoso *et al.*, 2005). No entanto, o diagnóstico molecular é problemático uma vez que, para além das mutações se distribuírem ao longo do gene *DHCR7*, até ao momento estão descritas 130 diferentes mutações, o que dificulta a pesquisa mutacional, uma vez que, nenhum simples teste genético sequencia todo o gene num curto espaço de tempo. A deleção

ou mutação na região promotora é outra das complicações para o diagnóstico molecular (Chevy *et al.*, 2005).

Vários estudos indicam que o diagnóstico de SLO pode ser realizado bioquimicamente com sucesso através da quantificação de 7-DHC e outros esteróis por GC-MS, o que permite um rápido e viável diagnóstico para SLO e pode ser realizado usando uma variedade de fluidos e tecidos biológicos (Kratz and Kelley, 1999).

1.7. Colesterol e embriogénese

Inicialmente, a descoberta de um defeito na biossíntese de colesterol como causa de SLO parecia explicar apenas alguns dos muitos sinais clínicos associadas à síndrome. Por exemplo, a hipoplasia dos genitais e os problemas alimentares poderiam ser atribuídos ao papel do colesterol como precursor da biossíntese de hormonas esteróides e de ácidos biliares, respectivamente. As anomalias no cérebro e no desenvolvimento do SNC, devem-se às necessidades de colesterol para a mielinização e à impermeabilidade da barreira hematoencefálica ao colesterol (pelo que, este tem que ser sintetizado localmente). Uma descoberta surpreendente, foi a do papel do colesterol na modificação e regulação das proteínas Hedgehog (Hh), o que permitiu ligar o metabolismo do colesterol directamente ao desenvolvimento embrionário e forneceu assim dados importantes para o conhecimento da patogénese da SLO (Waterham, 2000).

As proteínas Hedgehog (Hh) abrangem uma família de moléculas sinalizadoras embrionárias que são essenciais na embriogénese em vertebrados e invertebrados. Em vertebrados, como por exemplo nos humanos, foram descobertos três membros desta família, são eles: Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) e Indian Hedgehog (Ihh). A modificação pelo colesterol nas proteínas morfogénicas Hedgehog é essencial para uma normal sinalização Hedgehog (Waterham, 2000).

As três proteínas Hedgehog estão implicadas num número crescente de diferentes processos de desenvolvimento em vertebrados superiores, inclusive o desenvolvimento dos tubos neuronais, morfogénese do pulmão e do rim, desenvolvimento de cabelo (Shh), diferenciação sexual masculina, espermatogénese e desenvolvimento periférico de nervos (Dhh) e na morfogénese do esqueleto e desenvolvimento gastrointestinal (Ihh e Shh). Logo, a proteína Shh funciona na modelagem dos tubos neuronais e dos membros, Ihh é importante na

formação endocondral dos ossos e Dhh é necessário no desenvolvimento normal dos testículos (Waterham, 2000).

As Hh sofrem um processo autocatalítico, onde uma molécula de colesterol se liga covalentemente ao domínio de sinalização. A modificação pelo colesterol é necessária para uma normal sinalização das Hh, uma vez que, o colesterol liga as proteínas Hh à membrana plasmática e, altera a secreção e o movimento destas proteínas de sinalização durante o desenvolvimento. Na membrana, Hh interage com a proteína de membrana Patched (PTC) e liberta o efeito inibitório de PTC na proteína Smoothed (SMO), permitindo a transdução de sinal pelas Hh para o interior da célula, o que eventualmente conduz à activação da transcrição de genes envolvidos na embriogénese e na morfogénese (Koide *et al.*, 2006). Na ausência de Hh, PTC previne a transdução de sinal, por inibição da proteína de membrana SMO. Um distúrbio na sinalização das Hh pode provocar algumas das anomalias características das doenças da via de biossíntese de colesterol (Waterham, 2000).

Uma explicação simples para as anomalias morfogénicas em doentes com SLO será a redução do processo autocatalítico das proteínas Hh no desenvolvimento embrionário, devido aos baixos níveis de colesterol, ou à presença de esteróis anómalos, ou a ambos os factos. Experiências *in vitro* com Shh indicam que o processo também ocorre com o 7-DHC e desmosterol (Waterham, 2000). Os precursores de esteróis participam tão eficazmente como o colesterol nos processos de Shh e, desta forma, podem substituir o colesterol nas exigências estruturais, tais como constituintes de membranas de dupla camada (Yu and Patel, 2005). Enquanto que o 7-DHC pode substituir o colesterol no processo de ligação a proteínas Hedgehog, é improvável que intermediários, como os metilesteróis, possam executar estas funções (Herman, 2003).

Cooper *et al.* demonstrou que a sinalização das Shh em fibroblastos de SLO diminui ao nível das proteínas SMO, por diminuição dos níveis de esterol na membrana, o que indica que os níveis de esteróis totais, podem afectar o equilíbrio das formas activas e inactivas das proteínas SMO, e desta forma, afectar a via de transdução de sinal de Hedgehog (Porter, 2006).