

Agradecimentos

Quero aqui expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a minha formação e para que a realização deste trabalho fosse possível. Agradeço especialmente,

À Dra. Maria Luís Cardoso, que possibilitou a realização deste trabalho e por todo o apoio, confiança nas minhas capacidades, profissionalismo, incentivo, orientação científica, amizade, carinho e disponibilidade demonstrados. Muito obrigado!

À Prof.^a Cândida Tomaz, por todo o apoio, amizade, carinho, incentivo, orientação científica e disponibilidade demonstrados. Muito obrigado!

À Dra. Dulce Quelhas, por todo o apoio, incentivo, amizade e disponibilidade demonstrados. Muito Obrigado!

À Dra. Rosário Rodrigues, uma das minhas monitoras, por todo o apoio, incentivo, carinho, amizade, disponibilidade e profissionalismo demonstrados. Obrigado!

À Dra. Carla Valongo, outra das minhas monitoras, por todo o apoio, incentivo, disponibilidade e profissionalismo demonstrados. Obrigado!

Ao Eng.^o Joaquim Ferreira, Isaza, por todo o apoio técnico e disponibilidade demonstrados. Obrigado!

À Dra. Altina Lopes, Dra. Elisa Lopes e à D. Laura pelo grande apoio, incentivo, amizade e disponibilidade demonstrados. Muito obrigado!

À Direcção do INSA e do CGMJM, por permitir a minha formação nesta Instituição.

A todos os colaboradores da Unidade de Biologia Clínica do CGMJM, por todo o apoio, incentivo e disponibilidade demonstrados.

A todos os colaboradores da Unidade de Citogenética do CGMJM, pelo apoio e disponibilidade demonstrados.

Ao CICS da Universidade da Beira Interior, à Unidade de Enzimologia do CGMJM e à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me terem cedido material de laboratório, quando eu mais precisava.

Aos meus pais, por todo o amor, carinho, incentivo, apoio incondicional, paciência, dedicação e pelo grande exemplo que são para mim. Gosto muito de vocês!

Ao meu “manito”, Filipe, de quem gosto muito e por quem tenho muito carinho. Obrigado pelo apoio!

Aos meus avós e a minha *tia* “Tilinha”, por toda a motivação, amizade, carinho e incentivo sempre transmitidos.

A todos os meus restantes familiares por toda a amizade, carinho e incentivo sempre transmitidos.

Ao meu namorado Ricardo, de quem gosto muito, por toda a amizade, carinho, incentivo, paciência, dedicação e apoio incondicional demonstrados.

A todos os meus amigos, pela amizade, incentivo e apoio demonstrados.

À minha colega de casa, Margaret, pela amizade, incentivo e apoio demonstrados.

Às colegas de estágio e da instituição, algumas das quais grandes amigas, Márcia, Joana, Raquel, Ana e Dina pelos momentos passados, pela motivação, incentivo, amizade e apoio demonstrados.

Resumo

A síndrome Smith-Lemli-Optiz (SLO) (MIM 270400) é uma doença autossómica recessiva, de natureza metabólica, caracterizada por um padrão de dismorfias faciais minor, alterações dos membros e malformações congénitas múltiplas. Foi pela primeira vez descrita por Smith e colaboradores em 1964, e em 1993 foi considerada um erro hereditário da biossíntese de colesterol. É provocada por um defeito na enzima 7-dehidrocolesterol reductase (DHCR7) (E.C. 1.3.1.21), responsável pelo último passo da via de biossíntese de colesterol. A enzima DHCR7 é codificada pelo gene *DHCR7*. As mutações no gene *DHCR7* provocam SLO. A síndrome SLO caracteriza-se por hipocolesterolemia e níveis elevados de 7-dehidrocolesterol (7-DHC) no sangue e nos tecidos. A prevalência estimada de SLO varia entre 1/20.000 a 1/70.000 nados-vivos na população Caucasiana.

O colesterol e os precursores de colesterol (7-dehidrocolesterol (7-DHC), desmosterol e latosterol) são importantes marcadores bioquímicos da biossíntese de colesterol e a sua quantificação é útil para o diagnóstico de doenças da via de biossíntese de colesterol, em especial a síndrome SLO. Têm sido descritos na literatura vários métodos para a quantificação de esteróis. Entre eles o mais comum é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), operando num modo de ião selectivo (SIM).

O objectivo principal deste trabalho foi desenvolver um método analítico de cromatografia – cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), que permita a detecção, separação e quantificação de diversos esteróis em fluídos e tecidos biológicos. Uma vez que a metodologia de HPLC não permitiu a separação dos diversos esteróis numa mesma corrida cromatográfica, foi optimizado um método de GC-MS, que se mostrou linear e preciso, com múltiplas aplicações entre as quais permitir a quantificação dos diversos esteróis numa mesma corrida cromatográfica. O método de GC-MS baseia-se numa hidrólise alcalina dos ésteres de esteróis, extracção dos esteróis, derivatização e quantificação dos esteróis. O método é linear para o colesterol ($R^2 > 0.999$), 7-DHC ($R^2 > 0.998$), desmosterol ($R^2 > 0.999$), latosterol ($R^2 > 0.999$) e β -sitosterol ($R^2 > 0.999$). Os coeficientes de variação intra-série e inter-série foram 1.8% e 2.9% para o colesterol, 0.5% e 1.6% para o 7-DHC, 2.3% e 4.3% para o desmosterol, 2.2% e 3.2% para o latosterol e 0.9% e 2.7% para o β -sitosterol, respectivamente.

Foram aferidos valores de referência para os diversos esteróis em 330 amostras de líquidos amnióticos (LA) analisadas por GC-MS no modo SIM. As amostras foram agrupadas em função da idade gestacional – das 13 às mais de 22 semanas de gravidez. Os resultados demonstraram que com o avanço da gravidez, a concentração de colesterol no líquido amniótico aumenta, assim como os seus precursores e o β -sitosterol. Este facto está relacionado com a crescente necessidade de colesterol para o desenvolvimento fetal.

Foi também analisada por GC-MS uma amostra de um feto com suspeita clínica de SLO, onde a concentração de colesterol era baixa e os níveis de 7-DHC, latosterol e β -sitosterol encontravam-se aumentados, quando comparado com os valores de referência. Tendo em conta os resultados e o quadro clínico e bioquímico da patologia, o feto foi diagnosticado bioquimicamente como portador da síndrome SLO.

Este trabalho permitiu demonstrar que o intervalo dos valores de referência para cada esterol no LA, calculado para diferentes idades gestacionais (das 13 às mais de 22 semanas), é útil para a validação de resultados de um diagnóstico bioquímico pré-natal de erros inatos da via biossíntese de colesterol.

Estes estudos foram efectuados na Unidade de Biologia Clínica do Centro de Genética Médica Dr. Jacinto de Magalhães – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e parcialmente suportados pelo projecto 101/2007 da Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde.

Palavras-chave: Síndrome Smith-Lemli-Opitz (SLO); DHCR7; défices da via de biossíntese de colesterol; HPLC; GC-MS; líquido amniótico (LA); diagnóstico pré-natal; valores de referência; colesterol; 7-dehidrocolesterol (7-DHC); desmosterol, latosterol e β -sitosterol.

Abstract

The Smith-Lemli-Optiz syndrome (SLO) (MIM 270400) is an autosomal recessive metabolic disease, characterized by a pattern of facial dysmorphism, malformation of limbs and multiple congenital malformations. It was described by Smith and colleagues in 1964, and since 1993 it is known as an inherited error of metabolism of the cholesterol biosynthesis resulting from deficiency of the enzyme 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7) (E.C. 1.3.1.21), responsible for the last step of the cholesterol biosynthesis pathway. Mutations in the gene *DHCR7*, that encoding DHCR7, are responsible for SLO. The SLO syndrome is characterized by hypocholesterolemia and elevated serum concentration of 7-dehydrocholesterol (7-DHC) in blood and tissues. The birth prevalence of SLO is estimated to be approximately 1/20.000 to 1/70.000 live births in Caucasians.

Cholesterol and cholesterol precursors (7-dehydrocholesterol (7-DHC), desmosterol and lathosterol) are important biochemical markers of cholesterol biosynthesis, and their quantification is useful for the diagnosis of disorders of cholesterol biosynthesis pathway, specially the SLO syndrome. Several methods were described in literature for sterols quantification. Among them gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) with selected-ion monitoring (SIM) is the most common one.

The principal aim of our investigation was to develop an analytical chromatographic – high performance liquid chromatography (HPLC) method or gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) method, for sterols detection, separation and quantification in tissues and biological fluids. Since the HPLC method did not separate and quantify the sterols in a same chromatographic run, it was optimized a GC-MS method. The GC-MS method was based on the alkaline hydrolysis of sterol esters, extraction of free sterols, derivatization and quantification of sterols. The method was linear for cholesterol ($R^2 > 0.999$), 7-DHC ($R^2 > 0.998$), desmosterol ($R^2 > 0.999$), lathosterol ($R^2 > 0.999$) and β -sitosterol ($R^2 > 0.999$). Within-run and between-run coefficients of variation were 1.8% and 2.9% for cholesterol, 0.5% and 1.6% for 7-DHC, 2.3% and 4.3% for desmosterol, 2.2% and 3.2% for lathosterol and 0.9% and 2.7% for β -sitosterol, respectively.

The reference values were determined for the different sterols in 330 samples of amniotic fluids analysed by GC-MS with SIM. The samples were grouped by gestational age between 13 and more than 22 weeks of pregnancy. The results showed that as long as

pregnancy goes on, the concentration of cholesterol in amniotic fluid increases, as well as its precursors and β -sitosterol. This fact is related with the increased need of cholesterol of the developing fetus.

A sample of a fetus with clinical suspicion of SLO was also analysed by GC-MS. The concentration of cholesterol was decrease and the levels of 7-DHC, lathosterol and β -sitosterol were elevated, when compared with reference values. The results can biochemical diagnoses the fetus as a carried fetus SLO.

This work showed that the reference range of each sterol in amniotic fluid, calculated by different gestational age (13 to more than 22 weeks) is useful for validation of results of biochemical prenatal diagnosis of inborn errors of cholesterol biosynthesis other than SLO.

These studies were carried out in the Clinical Biology Unit of Medical Genetics of Center Dr. Jacinto Magalhães – National Health Institute of Dr. Ricardo Jorge, and was partially supported by project 101/2007 from “Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde”.

Keywords Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLO); DHCR7; disorders of cholesterol biosynthesis; HPLC; GC-MS; amniotic fluids (LA); prenatal diagnosis; reference values; cholesterol; 7-dehydrocholesterol (7-DHC); desmosterol; lathosterol and β -sitosterol.

Abreviaturas e siglas utilizadas

ACAT: acil-CoA-colesterol-acil-transferase;

ACIU: atraso de crescimento intra-uterino;

Apo: apolipoproteína (*Apolipoprotein*);

ApoE: apolipoproteína E;

A.R.: autossómica recessiva;

AY 9944: 1,4-bis (2-diclorobenzilaminometil) ciclohexano;

Brassicasterol: ergosta-5,22-dien-3 β -ol;

BM 15.766: ácido 4-(2-[1-(n-clorocinamil) piperazina-4-il] etil) benzóico;

bp: pares de base;

BSTFA: Bis(trimetil-silil)trifluoroacetamina;

°C: graus Celsius;

Calcitriol: 1,25-dihidroxi-colecalciferol;

cAMP: AMP cíclico;

CDCA: ácido quenodesoxicólico;

Colestanol: dihidrocolesterol;

CQI: controlo de qualidade interno; amostra LA controlo;

CTX: Xantomatose Cerebrotendinosa (*Cerebrotendinous Xanthomatosis*);

CYP27A1: esterol 27-hidroxilase (*Sterol 27-hydroxylase*);

CYP27A1: gene codificante da enzima CYP27A1;

CYP51: gene codificante da enzima lanosterol 14 α -demetilase /^{ou} Citocromo P51;

CoA: coenzima A;

7-DHC: 7-dehidrocolesterol (*7-dehydrocholesterol*);

8-DHC: 8-dehidrocolesterol (colesta-5,8-dien-3 β -ol) (*8-dehydrocholesterol*);

9-DDHC: 19-nor-5,7,9(10)-colestatrien-3 β -ol;

DAD: detector “diode-array” (detector ultra-violeta);

Desmosterol: colesta-5,7,24-tien-3 β -ol;

df: graus de liberdade;

Dhh: Desert Hedgehog;

DHCR7: 3 β -hidroxiesterol Δ^7 -reductase (*3 β -hydroxysterol Δ^7 -reductase*); 7-dehidrocolesterol reductase (*7-dehydrocholesterol reductase*); esterol Δ^7 -reductase;

- DHCR7:** gene codificante da enzima 3β -hidroxiesterol- Δ^7 -reductase;
- DHCR24:** 3β -hidroxiesterol Δ^{24} -reductase (*3 β -hydroxysterol Δ^{24} -reductase*); desmosterol reductase;
- DHCR24:** Gene codificante da enzima 3β -hidroxiesterol Δ^{24} -reductase;
- DHM:** doenças hereditárias do metabolismo;
- DNA:** ácido desoxirribonucleico;
- DPN:** diagnóstico pré-natal;
- EBP:** gene codificante da enzima 3β -hidroxiesterol $\Delta^{8,7}$ -isomerase /^{ou} Proteína de ligação a Emopamil;
- EIM:** erros inatos do metabolismo (*Inborn Errors of Metabolism*);
- Ergosterol:** ergosta-5,7,22-trien- 3β -ol;
- E.T.₁:** esteróis totais da via de biossíntese de colesterol;
- E.T.₂:** somatório dos precursores de colesterol;
- E.T.₃:** esteróis totais doseados neste trabalho;
- FID:** detector de “flame ionisation” (*Flame Ionisation Detector*);
- GC:** cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*);
- GC-MS:** cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (*Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*);
- GLC:** cromatografia gás-líquido (*Gas Liquid Chromatography*);
- H₀:** hipótese nula;
- H₁:** hipótese alternativa;
- HDL:** lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*);
- Hh:** proteína Hedgehog (*Hedgehog protein*);
- HMGR:** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductase (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase*);
- HMG-CoA:** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA*);
- HPLC:** cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*);
- Ihh:** Indian Hedgehog;
- L:** distância dos limites de controlo à linha central;
- LA:** líquido(s) amniótico(s);
- Latosterol:** colest-7-en- 3β -ol;
- LBR:** gene codificante da enzima 3β -hidroxiesterol Δ^{14} -reductase /^{ou} Receptor da lâmina B;

LCR: líquido cefalorraquidiano; fluído cérebro-espinhal;

LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (*Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*);

LDL: lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*);

LID: limite inferior de detecção;

LIQ: limite inferior de quantificação;

LIC: limite inferior de controlo;

LSC: limite superior de controlo;

LXR α : receptor hepático X;

M: molar;

MAHs: hélices associadas à membrana (*membrane-associated helices*);

mg: miligramas;

min.: minutos;

MIM: Base de dados das doenças mendelianas (*Mendelian Inheritance in Man*);

ml: mililitro;

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro;

MS: espectrometria de massa (*Mass Spectrometry*);

m/z: razão massa/carga;

nM: nanomolar;

n.º: número;

NADP⁺: forma oxidada do dinucleótido de adenina e α -nicotina;

NADPH: forma reduzida do dinucleótido de adenina e α -nicotina;

NPC1: proteína de Niemann-Pick tipo C (*Niemann-Pick type C protein*);

NSDHL: gene codificante da enzima 3 β -hidroxiesterol desidrogenase /^{ou} NADH esterol desidrogenase;

P: intervalo de confiança ou probabilidade de significância;

p.a.: pro-análise;

Pi: padrão interno;

PTC: proteína de membrana Patched (*membrane protein Patched*);

Q: estatística amostral;

QM: quilomicrons;

RE: retículo endoplasmático;

ref.: referência;

RNA: ácido ribonucleico;

SCAP: proteína activadora da clivagem de SREBP (*SREBP Cleavage-Activating Protein*);

SC5D: gene codificante da enzima 3 β -hidroxiesterol Δ^5 -desaturase /^{ou} Esterol C5-desaturase;

SD: desvio padrão;

SE: erro padrão;

Shh: Sonic Hedgehog;

SIM: monitorização selectiva de iões; modo de ião selectivo (*selective ion monitoring*);

SLO: Síndrome Smith-Lemli-Opitz (*Smith-Lemli-Opitz syndrome*);

SMO: proteína Smoothened (*Smoothened Protein*);

SNC: sistema nervoso central;

S/R: razão sinal/ruído;

SR1: esterol reductase 1;

SR2: esterol reductase 2;

SREBP: Proteína de ligação a elementos de regulação de esteróis (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*);

SRSSM: Domínio de sinalização esterol reductase (*Sterol Reductase Signature Motif*);

T.A.: temperatura ambiente;

TIC: espectro de massa;

tRNA: ácido ribonucleico de transferência;

UV: ultravioleta;

Vitamina D₃: colecalciferol;

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoproteins*);

X₀: quantidade inicial da amostra;

X.D.: dominante, ligada ao X;

μ : média;

μ E3: estriol não conjugado no soro materno;

μ Q: média da estatística amostral; linha central;

μ M: micromolar;

σ : desvio padrão;

σ Q: desvio padrão da estatística amostral;

α : nível de significancia;

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Abreviaturas e siglas utilizadas	VII
Índice Geral	XI
Índice de Figuras	XVI
Índice de Tabelas	XXI
1. Introdução	2
1.1. Erros Inatos do Metabolismo	2
1.1.1. História	3
1.1.2. Classificação	3
1.1.3. Manifestações Clínicas	6
1.1.4. Diagnóstico e Tratamento	8
1.2. Colesterol	8
1.2.1. Características químicas e biológicas	8
1.2.2. Funções	9
1.2.3. Absorção e transporte	10
1.3. Biossíntese de colesterol	12
1.3.1. Localização celular das enzimas de biossíntese do colesterol	14
1.3.2. Papel dos intermediários da biossíntese do colesterol	14
1.3.3. O colesterol e seus derivados	16
1.3.3.1. Síntese de sais biliares	17
1.3.3.2. Síntese de hormonas esteróides	17
1.3.3.3. Síntese de vitamina D	17
1.3.4. Regulação da biossíntese do colesterol	17
1.4. Aspectos bioquímicos da enzima 7-dehidrocolesterol reductase	19
1.4.1. Expressão enzimática	20
1.4.2. Topologia transmembranar	22
1.4.3. Especificidade	23
1.4.4. Inibidores	24

1.4.5. Regulação da actividade	24
1.5. Défices da biossíntese do colesterol	25
1.6. Síndrome Smith-Lemli-Opitz	29
1.6.1. Incidência	30
1.6.2. Aspectos clínicos	31
1.6.3. Aspectos bioquímicos	33
1.6.3.1. Concentrações de esteróis no plasma	34
1.6.3.2. Esteróis fecais e biliares e ácidos biliares	39
1.6.3.3. Esteróis no líquido amniótico	39
1.6.3.4. Hormonas esteróides	40
1.6.3.5. O 7-Deidrocolesterol e vitamina D	41
1.6.3.6. Efeitos nas Apolipoproteínas	41
1.6.3.7. Outras causas possíveis para níveis de 7-DHC aumentados	42
1.6.3.8. Consequências das alterações bioquímicas	42
1.6.4. Aspectos moleculares	44
1.6.4.1. Gene DHCR7	44
1.6.4.2. Mutações no gene DHCR7	45
1.6.4.3. Heterogeneidade do fenótipo e factores que o afectam	46
1.6.5. Síndrome Smith-Lemli-Opitz e Sistema Nervoso Central	47
1.6.6. Métodos de diagnóstico pré-natal da síndrome Smith-Lemli-Opitz	48
1.7. Colesterol e embriogénese	50
2. Objectivos do trabalho	53
3. Material e métodos	55
3.1. Material, equipamento e reagentes	55
3.1.1. Material	55
3.1.2. Equipamento	56
3.1.3. Reagentes e soluções	57
3.2. Amostras	58
3.3. Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para a análise de esteróis	59
3.3.1. Introdução à metodologia HPLC	59

3.3.2. Procedimento	62
A. Preparação dos padrões diluídos	62
B. Análise por HPLC	62
3.4. Método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa para a quantificação de esteróis em líquidos amnióticos	64
3.4.1. Introdução à metodologia	64
3.4.2. Princípio do método	68
3.4.3. Optimização do método cromatográfico	69
3.4.4. Procedimento	75
A. Preparação dos padrões de esteróis a partir das soluções mãe	76
B. Preparação das amostras LA: hidrólise, extracção de lípidos e obtenção do extracto seco	76
C. Derivatização	78
D. Análise por GC-MS	80
3.4.5. Validação do método	81
3.4.5.1. Linearidade do método	81
3.4.5.2. Repetibilidade	84
3.4.5.3. Reprodutibilidade	85
3.4.5.4. Cartas Controlo	86
3.4.5.5. Taxa de recuperação	91
3.4.5.6. Limite inferior de detecção e limite inferior de quantificação	93
3.4.6. Tratamento estatístico	94
4. Resultados e discussão dos resultados	
4.1. Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para a análise de esteróis	96
4.2. Método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa para a quantificação de esteróis em líquidos amnióticos	103
4.2.1. Cromatogramas	103
4.2.2. Quantificação dos esteróis	108
4.2.3. Valores de referência e tratamento estatístico	112
4.2.3.1. Intervalo de confiança para as médias da concentração	

de esterol em função das semanas de gestação	124
4.2.3.2. Correlações entre esteróis	131
4.2.3.3. Teste de hipóteses para avaliar a distribuição de esterol pelas várias semanas de gestação	144
4.2.3.4. Discussão dos resultados	148
4.2.4. Análise comparativa dos valores de referência	148
4.2.5. Quantificação de esteróis numa amostra de um feto com suspeita de síndrome Smith-Lemli-Opitz	151
4.2.5.1. Cromatogramas	151
4.2.5.2. Quantificação dos esteróis	153
4.2.5.3. Análise comparativa dos esteróis quantificados	156
4.2.6. Limitações do método	157
4.2.7. Discussão final dos resultados	158
5. Conclusão	162
6. Perspectivas futuras	165
7. Comunicações científicas realizadas no âmbito deste trabalho	167
8. Bibliografia	181
ANEXOS	
ANEXO A	187
A.1. Objectivo do trabalho	187
A.2. Introdução	187
A.3. Optimização do método cromatográfico	188
A.4. Material e equipamento	189
A.5. Reagentes e Soluções	190
A.5.1. Preparação dos padrões diluídos	191
A.6. Procedimento	192
A.6.1. Preparação das amostras para HPLC	192
A.6.2. Análise por HPLC	192
A.7. Resultados	193
A.7.1. Cromatogramas	193
A.7.2. Linearidade do método	194
A.7.3. Repetibilidade e reprodutibilidade	196

A.7.4. Cromatogramas de extractos celulares	198
A.8. Conclusão	199
A.9. Bibliografia	200
ANEXO B	206
B.1. Objectivo do trabalho	206
B.2. Introdução	206
B.2.1. Sinais Clínicos	209
B.2.2. Características bioquímicas	212
B.2.3. Estrutura do gene e da proteína	212
B.2.4. Mutações no gene CYP27A1	213
B.2.5. Incidência	214
B.2.6. Tratamento	215
B.3. Material e Métodos	216
B.3.1. Metodologia	216
B.3.2. Amostras	216
B.3.3. Material e equipamento	217
B.3.4. Reagentes e soluções	217
B.3.4.1. Preparação dos padrões	218
B.3.5. Procedimento	218
B.3.5.1. Hidrólise, extração de lípidos e obtenção de extracto seco	219
B.3.5.2. Preparação das amostras e padrões	219
B.3.5.3. Análise por HPLC	220
B.3.6. Plano de trabalho	220
B.4. Resultados e discussão dos resultados	221
B.4.1. Linearidade do método	221
B.4.2. Repetibilidade do método	222
B.4.3. Quantificação dos níveis de colestanol no soro	224
B.4.3.1. Cromatogramas	225
B.4.3.2. Quantificação do colestanol	226
B.5. Conclusão	229
B.6. Bibliografia	229

Índice de Figuras

Figura 1.1 Estrutura da molécula de colesterol.	9
Figura 1.2. Transporte de colesterol, através das diferentes lipoproteínas e transporte de colesterol reverso.	11
Figura 1.3. Esquema resumido das 4 fases da biossíntese do colesterol.	12
Figura 1.4. Reacções enzimáticas da fase terminal da síntese de colesterol – Via Kandutsch-Russell.	13
Figura 1.5. Via de biossíntese de colesterol.	16
Figura 1.6. Regulação da via de biossíntese do colesterol.	19
Figura 1.7. Topologia da membrana prevista para DHCR7.	22
Figura 1.8. Possíveis substratos para DHCR7 e produtos da reacção.	23
Figura 1.9. Biossíntese de colesterol.	28
Figura 1.10. Características fenotípicas de SLO.	33
Figura 1.11. Estrutura genómica de <i>DHCR7</i> humano.	44
Figura 3.1. Componentes base de um aparelho HPLC.	61
Figura 3.2. Equipamento de HPLC.	63
Figura 3.3. Representação esquemática de um sistema de GC.	65
Figura 3.4. Esquema representativo da separação de componentes de uma amostra num aparelho de cromatografia gasosa.	66
Figura 3.5. Cromatograma de uma mistura de colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol, lanosterol, colestanol, epicoprostanol e β -sitosterol na concentração de 8 μ mol/L, adquirido por CG-MS em modo de varrimento.	70
Figuras 3.6. Espectros de massa característicos de epicoprostanol, colesterol, 7-DHC, desmosterol, latosterol, β -sitosterol, colestanol e de lanosterol, respectivamente, obtidos pelo método GC-MS optimizado, com modo de ionização electrónica em modo de varrimento.	71
Figura 3.7. Representação esquemática das diversas etapas necessárias para a preparação das amostras de LA e doseamento de esteróis até à análise por GC-MS.	76
Figura 3.8. Sequência da preparação das amostras de LA desde a hidrólise, extracção de lípidos, obtenção do extracto seco até à derivatização.	79
Figura 3.9. Equipamento de cromatografia gasosa com detector de espectrometria	

de massa (<i>QP 2010 Plus, Shimadzu</i>).	80
Figura 3.10. Curvas de calibração do colesterol para o intervalo de concentrações 5 – 60 μM .	81
Figura 3.11. Curvas de calibração do desmosterol para o intervalo de concentrações 0.5 – 10 μM .	82
Figura 3.12. Curvas de calibração do 7-deidrocolesterol para o intervalo de concentrações 0.5 – 10 μM .	82
Figura 3.13. Curvas de calibração do latosterol para o intervalo de concentrações 0.5 – 10 μM .	83
Figura 3.14. Curvas de Calibração do β -sitosterol para o intervalo de concentrações 0.5 – 10 μM .	83
Figura 3.15. Carta de controlo para o colesterol. Legenda: LIC – limite inferior de controlo; LSC – limite superior de controlo.	88
Figura 3.16. Carta de controlo para o desmosterol. Legenda: LIC – limite inferior de controlo; LSC – limite superior de controlo.	88
Figura 3.17. Carta de controlo para o 7-deidrocolesterol. Legenda: LIC – limite inferior de controlo; LSC – limite superior de controlo.	89
Figura 3.18. Carta de controlo para o latosterol. Legenda: LIC – limite inferior de controlo; LSC – limite superior de controlo.	89
Figura 3.19. Carta de controlo para o β -sitosterol. Legenda: LIC – limite inferior de controlo; LSC – limite superior de controlo.	90
Figura 4.1. Cromatograma de HPLC de um padrão de colesterol com concentração de 125 μM .	96
Figura 4.2. Cromatograma de HPLC de um padrão de 7-DHC com concentração de 125 μM .	97
Figura 4.3. Cromatograma de HPLC de um padrão de desmosterol com concentração de 125 μM .	97
Figura 4.4. Cromatograma de HPLC de um padrão de lanosterol com concentração de 125 μM .	98
Figura 4.5. Cromatograma de HPLC de um padrão de latosterol com concentração de 125 μM .	98
Figura 4.6. Cromatograma de HPLC de um padrão de β -Sitosterol com	

concentração de 125 μM .	99
Figura 4.7. Cromatograma de HPLC de um padrão de colestanol com concentração de 125 μM .	99
Figura 4.8. Cromatograma de HPLC de uma mistura padrão de 7-DHC, colesterol, desmosterol, lanosterol, latosterol, colestanol e β -sitosterol com concentração de 125 μM .	100
Figura 4.9. Cromatograma de HPLC de uma mistura padrão de colesterol e latosterol com concentração de 125 μM .	101
Figura 4.10. Cromatograma em modo de varrimento de uma mistura padrão de esteróis com concentração de 40 μM para o colesterol e de 5 μM para o latosterol, 7-DHC, desmosterol e β -sitosterol.	104
Figura 4.11. Cromatograma em modo SIM de uma mistura padrão de esteróis com concentração de 40 μM para o colesterol e de 5 μM para o latosterol, 7-DHC, desmosterol e β -sitosterol.	105
Figura 4.12. Cromatograma em modo de varrimento de uma amostra LA com 16 semanas de gestação. As linhas com cores representam o comportamento dos iões seleccionados para cada esterol.	106
Figura 4.13. Cromatograma em modo SIM de uma amostra de líquido amniótico de um feto sem patologia, com 16 semanas de gestação.	107
Figura 4.14. Estrutura química do 7-DHC e desmosterol.	108
Figura 4.15. Cromatograma de um padrão de desmosterol com concentração 10 μM .	110
Figura 4.16. Espectro de massa global de um padrão de desmosterol com concentração 10 μM .	111
Figura 4.17. Diagrama de extremos e quartis da concentração de colesterol (μM) em função das semanas de gestação.	117
Figura 4.18. Diagrama de extremos e quartis da concentração de desmosterol (μM) em função das semanas de gestação.	117
Figura 4.19. Diagrama de extremos e quartis da concentração de 7-dehidrocolesterol (μM) em função das semanas de gestação.	118
Figura 4.20. Diagrama de extremos e quartis da concentração de latosterol (μM) em função das semanas de gestação.	118

Figura 4.21. Diagrama de extremos e quartis da concentração de β -sitosterol (μM) em função das semanas de gestação.	119
Figura 4.22. Gráfico de dispersão da concentração de colesterol (μM) em função das semanas de gestação.	121
Figura 4.23. Gráfico de dispersão da concentração de desmosterol (μM) em função das semanas de gestação.	122
Figura 4.24. Gráfico de dispersão da concentração de 7-dehidrocolesterol (μM) em função das semanas de gestação.	122
Figura 4.25. Gráfico de dispersão da concentração de latosterol (μM) em função das semanas de gestação.	123
Figura 4.26. Gráfico de dispersão da concentração de β -sitosterol (μM) em função das semanas de gestação.	123
Figura 4.27. Representação gráfica (Error Bar) do intervalo de confiança a 95% para as médias da concentração de colesterol (μM) em função das semanas de gestação.	126
Figura 4.28. Representação gráfica (Error Bar) do intervalo de confiança a 95% para as médias da concentração de desmosterol (μM) em função das semanas de gestação.	127
Figura 4.29. Representação gráfica (Error Bar) do intervalo de confiança a 95% para as médias da concentração de 7-dehidrocolesterol (μM) em função das semanas de gestação.	128
Figura 4.30. Representação gráfica (Error Bar) do intervalo de confiança a 95% para as médias da concentração de latosterol (μM) em função das semanas de gestação.	129
Figura 4.31. Representação gráfica (Error Bar) do intervalo de confiança a 95% para as médias da concentração de β -sitosterol (μM) em função das semanas de gestação.	130
Figura 4.32. Diagrama de extremos e quartis do somatório das concentrações (μM) dos esteróis da via de biossíntese de colesterol (E.T. ₁ – somatório dos esteróis colesterol, latosterol, 7-DHC e desmosterol), em função das semanas de gestação.	140
Figura 4.33. Diagrama de extremos e quartis do somatório das concentrações	

(μM) dos precursores de colesterol (E.T. ₂ – somatório dos esteróis latosterol, 7-DHC e desmosterol), em função das semanas de gestação.	142
Figura 4.34. Diagrama de extremos e quartis do somatório das concentrações (μM) de todos os esteróis doseados neste trabalho (colesterol, latosterol, desmosterol, 7-DHC e β -sitosterol), em função das semanas de gestação.	144
Figura 4.35. Cromatograma, em modo SIM, de uma amostra LA de um feto com suspeita de síndrome Smith-Lemli-Opitz, com 15 semanas de gestação.	152
Figura A.1. Estrutura do 7-deidrocolesterol, colesterol, ergosterol e brassicasterol.	188
Figura A.2. Representação esquemática das diversas etapas necessárias para o doseamento enzimático da 7-deidrocolesterol reductase e doseamento de ergosterol, brassicasterol, colesterol e 7-DHC até ao ensaio de HPLC.	192
Figura A.3. Cromatograma característico de uma mistura de ergosterol, brassicasterol, 7-DHC e colesterol com concentração de $125\mu\text{M}$.	193
Figura A.4. Curvas de Calibração do ergosterol e brassicasterol para o intervalo de concentrações 8 - $250\mu\text{M}$.	194
Figura A.5. Curvas de Calibração do colesterol e 7-DHC para o intervalo de concentrações 10 – $333\mu\text{M}$.	195
Figura A.6. Cromatograma característico de um Controlo Normal.	198
Figura A.7. Cromatograma característico de um doente com Síndrome Smith-Lemli-Opitz (SLO).	199
Figura B.2.1. Conversão hepática de colesterol a ácidos biliares.	207
Figura B.2.2. Metabolismo dos ácidos biliares nos indivíduos com CTX.	208
Figura B.2.3. Sequência de reacções de conversão de 7α -Hidroxi-4-colesten-3-ona a colestanol.	208
Figura B.2.4. Dois Xantomas no tendão junto aos joelhos.	211
Figura B.2.5. Xantoma no Tendão de Aquiles.	211
Figura B.4.1. Recta de Calibração do colestanol.	222
Figura B.4.2. Cromatograma obtido por análise HPLC com detector DAD de um padrão de colestanol com concentração de $100\mu\text{M}$.	225
Figura B.4.3. Cromatograma de HPLC de uma amostra de soro com sobrecarga de um padrão de colestanol com concentração de $100\mu\text{M}$.	226

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Sinais Clínicos sugestivos de DHM.	7
Tabela 1.2. Défices na biossíntese de colesterol pós-esqualeno.	26
Tabela 1.3. Aspectos clínicos observados nas doenças humanas da biossíntese pós-esqualeno de colesterol.	27
Tabela 1.4. Sinais Clínicos da Síndrome Smith-Lemli-Opitz.	32
Tabela 1.5. Níveis de colesterol, 7-DHC, 8-DHC e outros esteróis no plasma de doentes SLO e grupos controlo.	36
Tabela 1.6. Tabela sobre a composição de esteróis nos diversos órgãos de um feto com 20 semanas.	38
Tabela 3.1. Tabela com os iões seleccionados como principais para cada esterol e respectivos tempos de retenção.	74
Tabela 3.2. Tabela com as janelas de aquisição para os diferentes iões seleccionados como principais para cada esterol.	75
Tabela 3.3. Tabela com os reagentes e soluções padrão necessários para a preparação das amostras de LA e curva de calibração.	77
Tabela 3.4. Tabela com as concentrações determinadas para cada esterol, em cada extração da amostra LA, e respectivos coeficientes de variação intra-série, para a avaliação da repetibilidade do método.	84
Tabela 3.5. Tabela com os valores médios de concentração obtidos para cada esterol, em cada série, e respectivos coeficientes de variação inter-série, para a avaliação da reprodutibilidade do método.	85
Tabela 3.6. Tabela com os valores de concentração obtidos para cada esterol em cada amostra LA controlo, utilizados nas cartas de controlo.	87
Tabela 3.7. Tabela com as concentrações obtidas para cada esterol em cada ensaio e para cada amostra, e respectivas taxas de recuperação (%) e coeficientes de variação (%).	92
Tabela 3.8. Tabela com os limites inferiores de detecção (LID) e quantificação (LIQ) em nM para cada esterol.	94
Tabela 4.1. Tabela com os valores de factor de resposta do desmosterol para os iões 325 e 351.	109

Tabela 4.2. Estatística descritiva da concentração de colesterol (μM) em função das semanas de gestação.	113
Tabela 4.3. Estatística descritiva da concentração de desmosterol (μM) em função das semanas de gestação.	113
Tabela 4.4. Estatística descritiva da concentração de 7-dehidrocolesterol (μM) em função das semanas de gestação.	114
Tabela 4.5. Estatística descritiva da concentração de latosterol (μM) em função das semanas de gestação.	114
Tabela 4.6. Estatística descritiva da concentração de β -Sitosterol (μM) em função das semanas de gestação.	115
Quadro 1. Quadro resumo com os valores de referência de cada esterol para cada semana de gestação.	116
Tabela 4.7. Tabela com as médias e intervalo de confiança a 95% para as médias de cada esterol, em função das semanas de gestação.	125
Tabela 4.8. Coeficiente de correlação de Pearson entre os vários esteróis, independentemente do número de semanas de gestação.	131
Tabela 4.9. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 13 ^o . semana de gestação.	133
Tabela 4.10. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 14 ^o . semana de gestação.	133
Tabela 4.11. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 15 ^o . semana de gestação.	134
Tabela 4.12. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 16 ^o . semana de gestação.	134
Tabela 4.13. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 17 ^o . semana de gestação.	135
Tabela 4.14. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 18 ^o . semana de gestação.	135
Tabela 4.15. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 19 ^o . semana de gestação.	136
Tabela 4.16. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 20 ^o . semana de gestação.	136

Tabela 4.17. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 21.ª semana de gestação.	137
Tabela 4.18. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para a 22.ª semana de gestação.	137
Tabela 4.19. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis para o grupo das mais de 22 semanas de gestação.	138
Tabela 4.20. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis da via de biossíntese de colesterol versus esteróis totais da via de biossíntese de colesterol.	139
Tabela 4.21. Coeficientes de correlação de Pearson entre os precursores de colesterol (somatório de latosterol, desmosterol e 7-DHC) versus colesterol.	141
Tabela 4.22. Coeficientes de correlação de Pearson entre os vários esteróis versus esteróis totais doseados neste trabalho.	143
Tabela 4.23. Estatísticas dos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para os diferentes esteróis.	146
Tabela 4.24. Estatísticas do teste não-paramétrico das medianas para os diferentes esteróis, com a variável de grupo definida para as semanas de gestação.	147
Tabela 4.25. Tabela com a comparação de valores de referência para os diversos esteróis em líquidos amnióticos, determinados pelo método aqui descrito e por métodos descritos na literatura.	150
Tabela 4.26. Concentração em μM de cada esterol numa amostra LA de um feto com suspeita de síndrome Smith-Lemli-Opitz, analisada em duplicado.	153
Tabela 4.27. Concentração em μM para cada esterol e razão esterol/esteróis totais da via de biossíntese de colesterol, em amostras LA de fetos sem patologia e numa amostra de um feto com suspeita de síndrome Smith-Lemli-Opitz, de 15 semanas de gestação.	153
Tabela 4.28. Tabela com a comparação das concentrações em μM para os diversos esteróis, determinadas pelo método aqui descrito e por métodos descritos na literatura em doentes com síndrome Smith-Lemli-Opitz.	156
Tabela A.1. Áreas dos picos cromatográficos para as diferentes concentrações do padrão de ergosterol e brassicasterol.	194
Tabela A.2. Áreas dos picos cromatográficos para as diferentes concentrações do	

padrão de colesterol e 7-deidrocolesterol.	195
Tabela A.3. Valores obtidos para a repetibilidade de todos os esteróis.	197
Tabela A.4. Valores obtidos para a reprodutibilidade de todos os esteróis.	197
Tabela B.1.1. Quadro resumo das características clínicas descritas em casos com diagnóstico de CTX.	210
Tabela B.2.2. Levantamento de casos descritos de doentes portugueses com CTX.	215
Tabela B.3.1. Tabela com o plano de trabalho de todos os ensaios com amostras de soro realizados.	221
Tabela B.4.1. Áreas dos picos cromatográficos para as diferentes concentrações do padrão de colestanol.	222
Tabela B.4.2. Valores obtidos no ensaio do próprio dia.	223
Tabela B.4.3. Levantamento bibliográfico de valores de referência dos níveis de colestanol no soro descritos em doentes com Xantomatose Cerebrotendinosa e grupos controlo.	224
Tabela B.4.4. Concentrações de colestanol determinadas nas diferentes amostras de soro utilizadas nos diferentes ensaios.	227