

CICS, Universidade da Beira Interior

Instituto de Genética Médica Dr. Jacinto Magalhães

Quantificação de Esteróis em Amostras de Líquidos Amnióticos por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa

Amaral, C.; Valongo, C.; Quelhas, D.; Tomaz, C. T.; Cardoso, M. L.

Colesterol

- Lípido neutro. Molécula de 27 carbonos;
- Componente importante:
 1. das membranas plasmáticas e mitocondriais (fluidez da membrana);
 2. das bainhas de mielina do SNC e periférico;
- Precursor de uma vasta gama de moléculas: hormonas esteróides, sais biliares, oxisteróides e neuroesteróides.
- Função na embriogénese e morfogénese.
- Alguns esteróis (precursores do colesterol), são compostos biologicamente activos e de importância fisiológica – **marcadores bioquímicos da biossíntese de colesterol.**

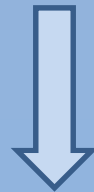
Erros Hereditários na Biossíntese de Colesterol



Síndromes polimalformativas que provocam uma **diminuição da biossíntese endógena de colesterol** e a **acumulação de precursores esteróis**.



Latosterolose

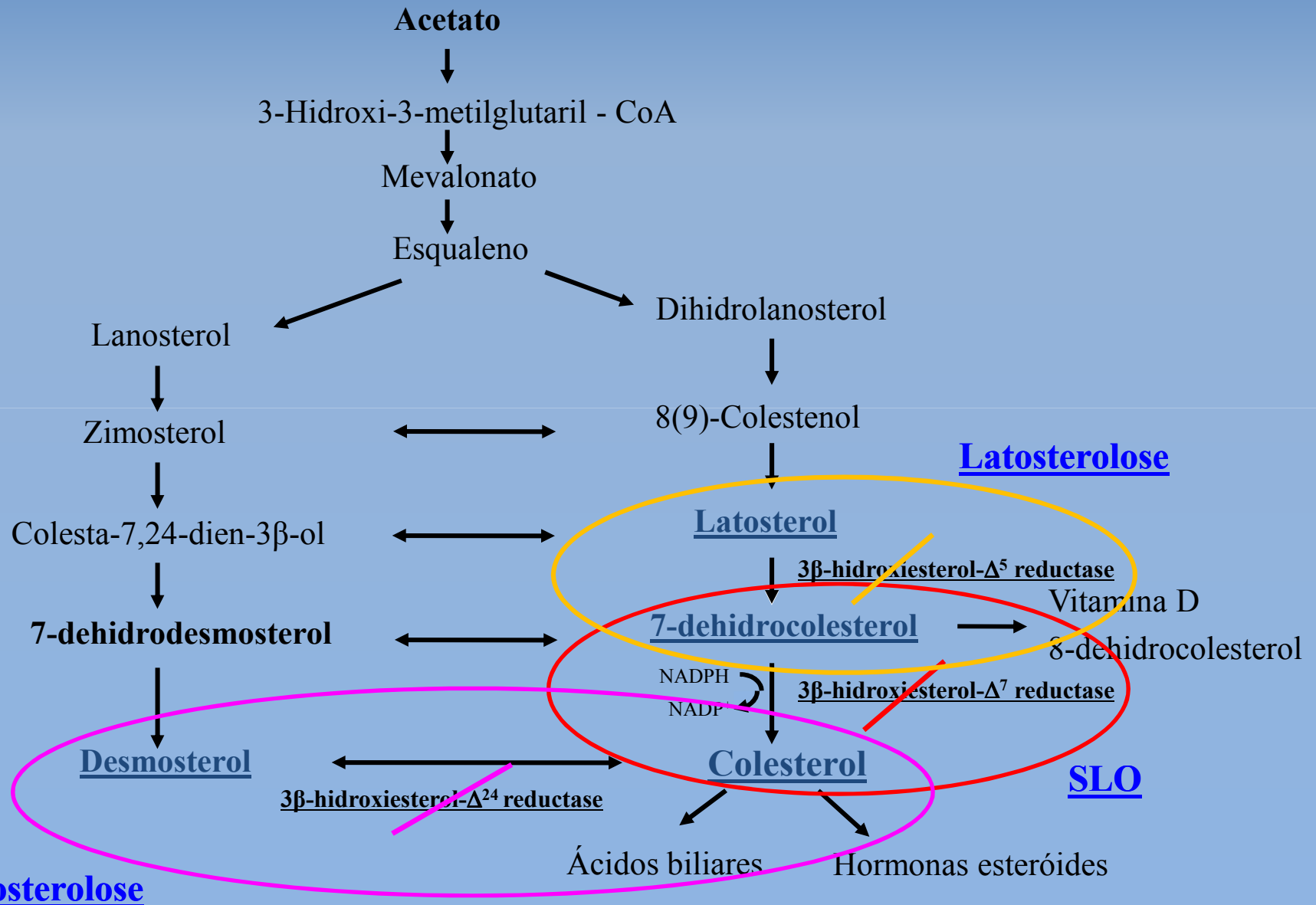


**Síndrome Smith-Lemli-Opitz
(SLO)**



Desmosterolose

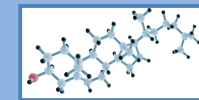
Défices da Biossíntese de Colesterol



Latosterolose (MIM 607330)

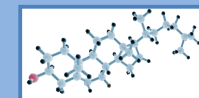
- Transmissão autossômica recessiva;
- Défice da enzima **3 β -hidroxiesterol- Δ^5 reductase**;
- Apenas 2 casos descritos na literatura;
- Características bioquímicas:
 - ↓ Colesterol
 - ↑ **Latosterol**

(Porter, 2002)



Desmosterolose (MIM 602398)

- Transmissão autossômica recessiva;
- Défice da enzima **3 β -hidroxiesterol- Δ^{24} reductase (DHCR24)**;
- Apenas 2 casos descritos na literatura;
- Características bioquímicas:
 - ↓ Colesterol;
 - ↑ **Desmosterol**



(Herman, 2003; Clayton, 1998; Porter, 2002)

Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (MIM 270400)

- Transmissão autossômica recessiva;
- Défice da enzima **7-dehidrocolesterol reductase (DHCR7)**;
- Incidência: 1/10.000 – 60.000 indivíduos;
- Características bioquímicas:
 - **↑ 7-Dehidrocolesterol (7-DHC)**;
 - **↓ Colesterol**;
 - **↑ 8-Dehidrocolesterol (8-DHC)**.

Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (MIM 270400)

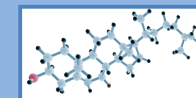
➤ Características fenotípicas:

- Microcefalia;
- Narinas antevertidas;
- Polidactilia;
- Síndrome de malformação;
- Sindactilia dos 2º e 3º dedos dos pés;
- Ambiguidade genital no sexo masculino;
- Atraso mental.



Características fenotípicas SLO
(retirado de Porter, 2002)

(Herman, 2003; Clayton, 1998; Porter, 2008)



Objectivo

- Optimizar um método de **Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (GC/MS)**, que permita a identificação e quantificação em simultâneo de diversos esteróis: **colesterol**, **7-DHC**, **desmosterol** e **latosterol** em diferentes amostras biológicas.
- Estabelecer **valores de referência para os diversos esteróis em líquidos amnióticos (LA)** de fetos normais, com diferentes semanas de gestação (13 – 22 semanas).

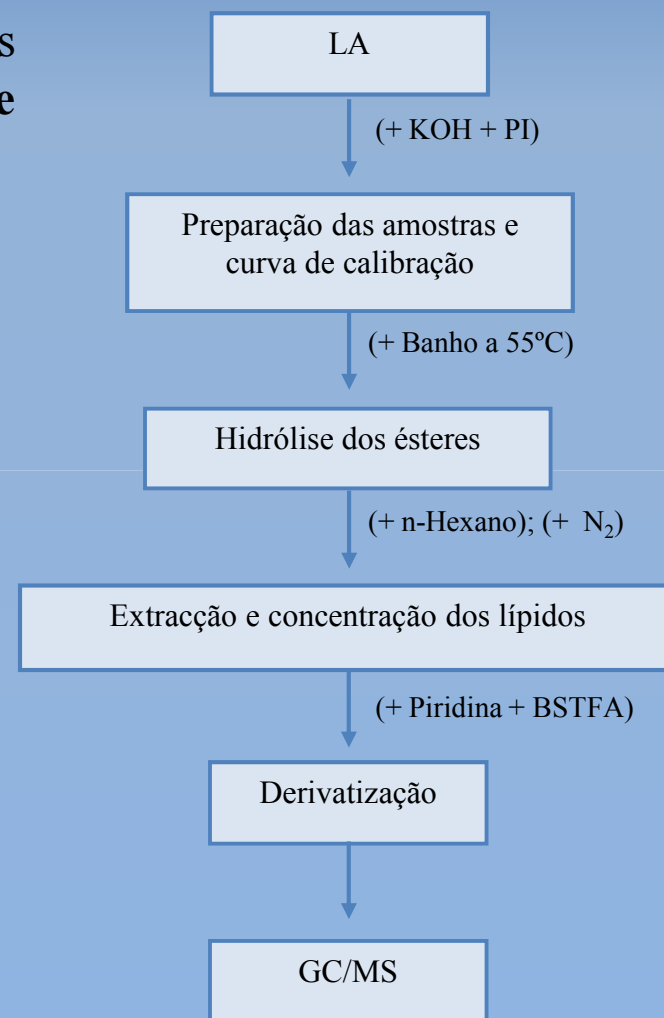
Metodologia para a quantificação dos esteróis

➤ **100 amostras de LA**, agrupadas por diferentes idades gestacionais – das **13 às 22 semanas de gestação**.

➤ **Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)** (*QP 2010 Plus®*, Shimadzu com software *Labsolutions – GCMS solutions Shimadzu*), **operando num modo de ião selectivo (SIM)**.

Coluna apolar, de sílica (Coluna *Equity™-1*, *Supelco*) (15m x 0.1mm x 0.1µm).

➤ Utiliza-se como **padrão interno** o **epicoprostanol**.



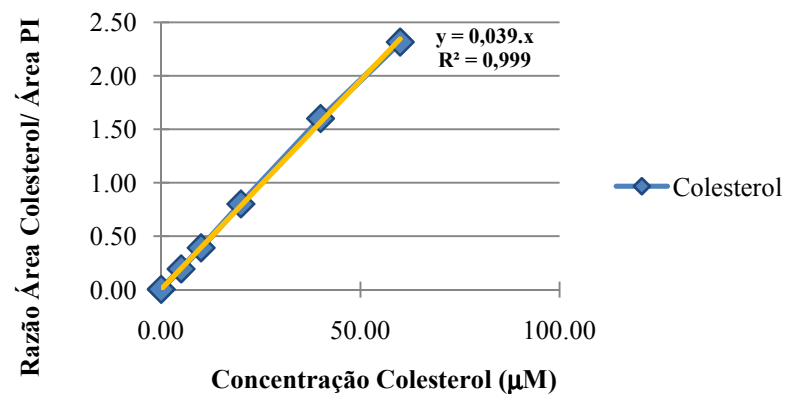
➤ **Condições de detecção no GC/MS:**

- Volume de amostra: 1 µl;
- Razão de split: 40;
- Gás de arrasto: Hélio com pressão 535.9 kPa (fluxo total de 25.7mL/min, fluxo da coluna: 0.55mL/min);
- Temperatura do injetor é de 300°C e a da linha de transferência 290°C;
- Programa: temperatura inicial de 250°C durante 2 min. e 60s, subindo depois à velocidade de 8°/min. até 300°C;
- Duração da corrida: 11 min. e 5s.

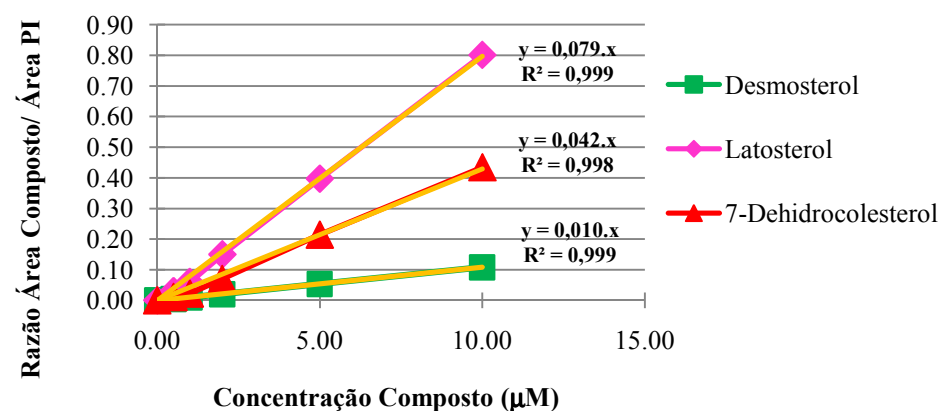
➤ Os esteróis foram **identificados pelos respectivos tempos de retenção, espectros de massa e quantificados pelos iões (m/z) mais comuns.**

Composto	Iões (m/z)	Tempos de retenção (minutos)
Epicoprostanol	370	7.79
Colesterol	329	8.30
7-DHC	325	8.54
Desmosterol	343	8.52
Latosterol	255	8.66

Validação do método



Concentração de Colesterol (µM) : 0, 5, 10, 20, 40 e 60



Concentração de cada composto (µM) : 0, 0.5, 1, 2, 5 e 10

Composto	Coef. Variação (%) Intra-série (n= 5 ensaios no mesmo dia)	Coef. Variação (%) Inter-série (n= 5 dias)
Colesterol	1.8	2.8
7-DHC	0.5	3.5
Latosterol	2.2	2.6
Desmosterol	2.3	3.2

O método é linear, tem uma boa repetibilidade e reprodutibilidade para todos os esteróis.

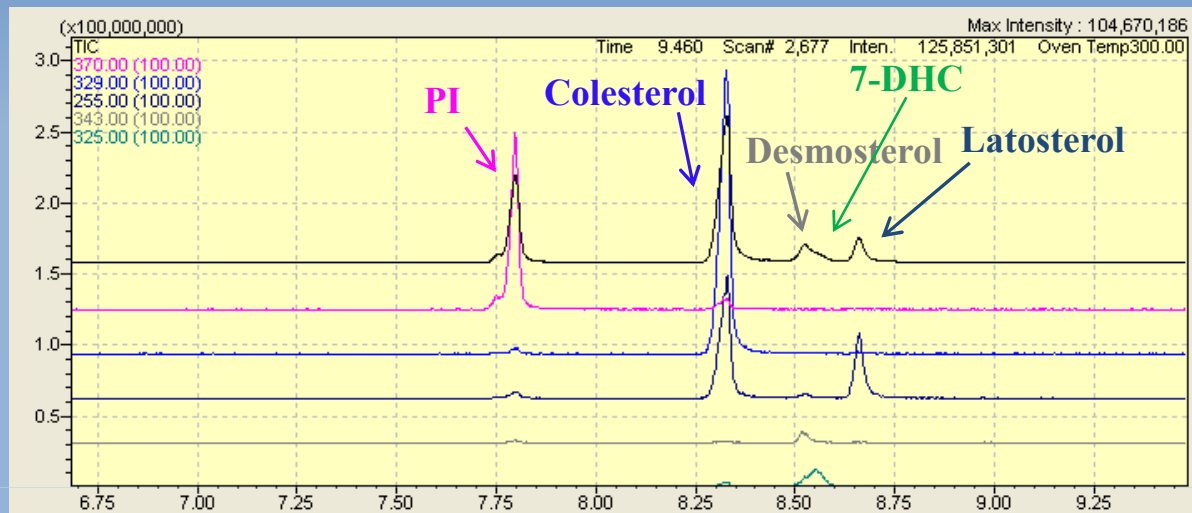
Limite de detecção e quantificação dos esteróis

Composto	Limite inferior de detecção (LID) (nmol/L)	Limite inferior de quantificação (LIQ) (nmol/L)
Colesterol	10	50
7-DHC	0.8	1
Latosterol	1	5
Desmosterol	5	10

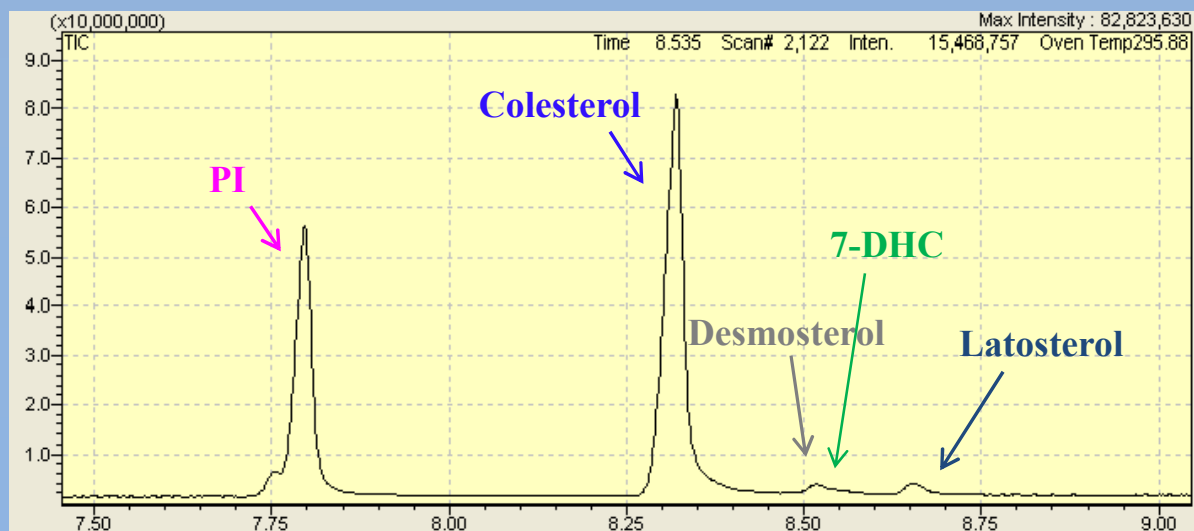
Limite inferior de detecção (LID): razão sinal/ruído = 3.

Limite inferior de quantificação (LIQ): razão sinal/ruído = 10.

Cromatogramas



Cromatograma de um padrão de esteróis com concentração de $40\mu\text{M}$ para o colesterol e de $5\mu\text{M}$ para o latosterol, 7-DHC e desmosterol.



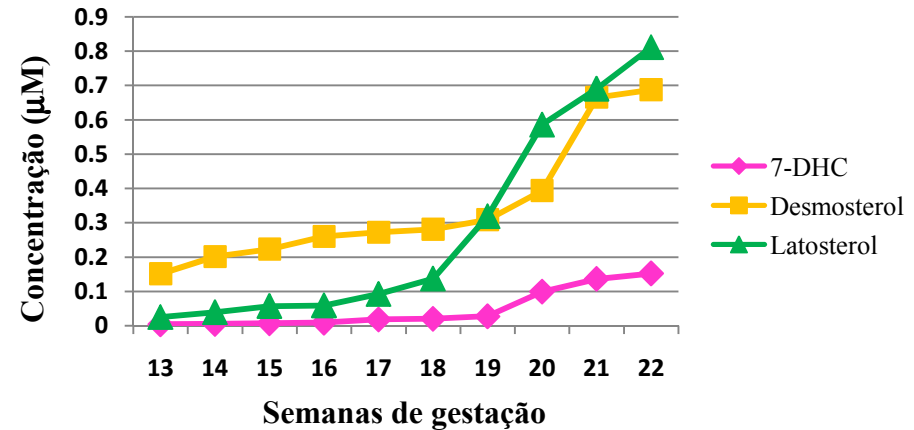
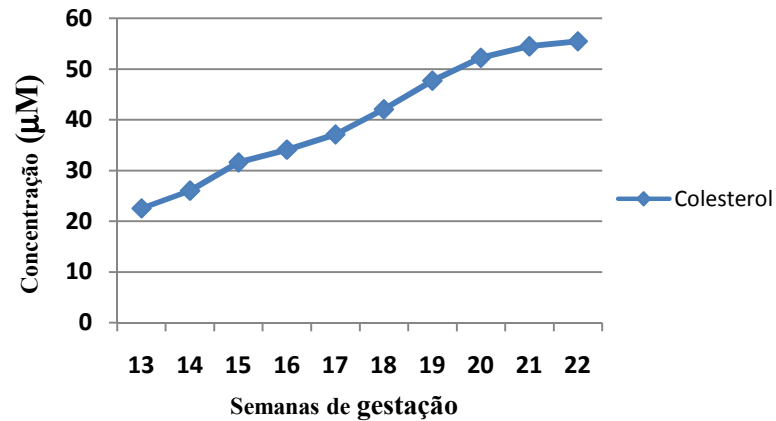
Cromatograma de um líquido amniótico com 16 semanas de gestação.

Valores de referência dos esteróis

❑ **Quantificação dos esteróis: modo SIM** (identificação dos compostos pelo iões característicos (m/z)), através da integração das áreas dos respectivos compostos, pelo método do padrão interno e utilizando curvas de calibração.

❑ “Range” de concentrações em $\mu\text{mol/L}$ de cada esterol (média \pm SD) :

Idade de gestação (semanas)	Colesterol	7-DHC	Desmosterol	Latosterol
13	22.540 \pm 2.304	0.004 \pm 0.002	0.151 \pm 0.049	0.025 \pm 0.0077
14	26.016 \pm 3.511	0.005 \pm 0.002	0.201 \pm 0.029	0.039 \pm 0.0206
15	31.595 \pm 6.860	0.007 \pm 0.005	0.223 \pm 0.039	0.057 \pm 0.023
16	34.101 \pm 4.390	0.009 \pm 0.003	0.260 \pm 0.043	0.059 \pm 0.022
17	37.103 \pm 5.182	0.018 \pm 0.006	0.272 \pm 0.143	0.092 \pm 0.038
18	42.054 \pm 3.441	0.020 \pm 0.006	0.281 \pm 0.078	0.137 \pm 0.082
19	47.703 \pm 3.596	0.027 \pm 0.007	0.309 \pm 0.079	0.319 \pm 0.097
20	52.207 \pm 5.890	0.099 \pm 0.001	0.394 \pm 0.034	0.586 \pm 0.067
21	54.466 \pm 6.764	0.136 \pm 0.019	0.666 \pm 0.144	0.691 \pm 0.073
22	55.443 \pm 2.593	0.152 \pm 0.015	0.688 \pm 0.046	0.812 \pm 0.134



➤ Com o aumento da idade de gestação, a quantidade de esteróis no LA também **umenta**.

➤ Há um acentuado aumento da concentração de colesterol com o aumento das semanas de gestação.



Este aumento deve-se à crescente necessidade de colesterol para o desenvolvimento do feto.

O aumento dos precursores é explicado pelo aumento da síntese endógena de colesterol.

Conclusões

- O método é **sensível e preciso**, permitindo a identificação, separação e quantificação do **colesterol**, **7-DHC**, **desmosterol** e **latosterol** nos fluídos biológicos.
- Os resultados indicam que com o **avanço da gravidez**, a **concentração de colesterol e respectivos precursores aumenta**. Este facto está relacionado com a necessidade de colesterol para o desenvolvimento fetal.
- Os valores de referência determinados para cada esterol no LA nas diferentes semanas de gestação são úteis para a **validação dos resultados no diagnóstico bioquímico pré-natal de erros inatos da biossíntese de colesterol**, principalmente para o diagnóstico da Síndrome Smith-Lemli-Opitz, podendo também aplicar-se a situações de Latosterolose e Desmosterolose.
- O desenvolvimento do método permitiu **diminuir em cerca de 60%** o tempo de análise de cada amostra quando comparado com a metodologia previamente utilizada.

Bibliografia

- **Ahmida**, H.S.M; Bertucci, P.; Franzò, L.; Massoud, R.; Cortese, C.; Lala, A.; Federici, G. (2006). “Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM).” *Journal of Chromatography B*; 842: 43-47.
- **Chevy**, F.; Humbert, L.; Wolf, C. (2005). “Sterol profiling of amniotic fluid: a routine method for the detection of distal cholesterol synthesis deficit.” *Prenatal Diagnosis*; 25: 1000-1006.
- **Clayton**, P.T. (1998). “Disorders of cholesterol biosynthesis.” *Arch. Dis. Child*; 78: 185–189.
- **Herman**, G.E. (2003). “Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation Syndromes.” *Human Molecular Genetics*; 12: 75–88.
- **Irons**, M.B. e **Tint**, G.S. (1998). “Prenatal diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome.” *Prenatal Diagnosis*; 18: 369 - 372.
- **Kelley**, R.I. (1995). “Diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome by gas chromatography/mass spectrometry of 7-dehydrocholesterol in plasma, amniotic fluid and cultured skin fibroblasts.” *Clinica Chimica Acta*; 236: 45-58.
- **Kratz**, E.L. e **Kelley**, R.I. (1999). “Prenatal diagnosis of the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome.” *American Journal of Medical Genetics*; 82: 376 -381.
- **Porter**, F.D. (2002). “Malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis.” *The Journal of Clinical Investigation*; 110: 715-724.
- **Porter**, F.D. (2008). “Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management.” *European Journal of Human Genetics*; 16: 535 – 541.

Obrigado pela vossa atenção!



Agradecimentos:

Dr. Maria Luís Cardoso (IGMJM e FFUP);

Prof. Cândida Tomaz (CICS – UBI);

Dr. Dulce Quelhas (IGMJM);

Carla Valongo (IGMJM);

Eng. Joaquim Ferreira (Isaza);

Este trabalho é parcialmente financiado pelo projecto 101/2007 da Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde.