

Anexo A

Anexo A

Doseamento de esteróis por HPLC - Quantificação de ergosterol, brassicasterol, 7-DHC e colesterol em amostras biológicas

A.1. Objectivo do Trabalho

Identificar e quantificar diversos esteróis, nomeadamente o colesterol, 7-dehidrocolesterol (7-DHC), ergosterol e brassicasterol, utilizando um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector “diode-array” (DAD).

Validar o método cromatográfico de HPLC, por determinação da linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade.

A.2. Introdução

O método cromatográfico HPLC foi desenvolvido e aferido para permitir a separação e a detecção de ergosterol, brassicasterol, colesterol, 7-DHC entre outros esteróis em amostras biológicas: culturas de células, soros e líquidos amnióticos.

O colesterol e o 7-DHC são esteróis comuns nos mamíferos, enquanto o ergosterol e o brassicasterol são esteróis das leveduras. Ambos os esteróis estão quimicamente relacionados, uma vez que o colesterol e o brassicasterol são obtidos pela redução da dupla ligação Δ^7 do 7-DHC e ergosterol, respectivamente (Honda *et al.*, 1996).

O ergosterol é um produto estável, proveniente da biossíntese de esteróis nas leveduras e difere estruturalmente do colesterol por um grupo metilo adicional na cadeia lateral, no átomo de carbono C-24 e, pela presença de uma dupla ligação no Δ^{22} e no Δ^7 . A presença da dupla ligação Δ^7 é uma característica partilhada com o 7-DHC, o substrato natural da enzima 7-dehidrocolesterol reductase (DHCR7) (Waterham *et al.*, 2000), no entanto, difere do 7-DHC, por uma ligação dupla adicional no Δ^{22} e por um grupo metil no C-24 (Shefer *et al.*, 1998).

Quando comparado com o colesterol, o brassicasterol tem um grupo metilo extra em C-24 e uma dupla ligação adicional em Δ^{22} (Waterham *et al.*, 2000).

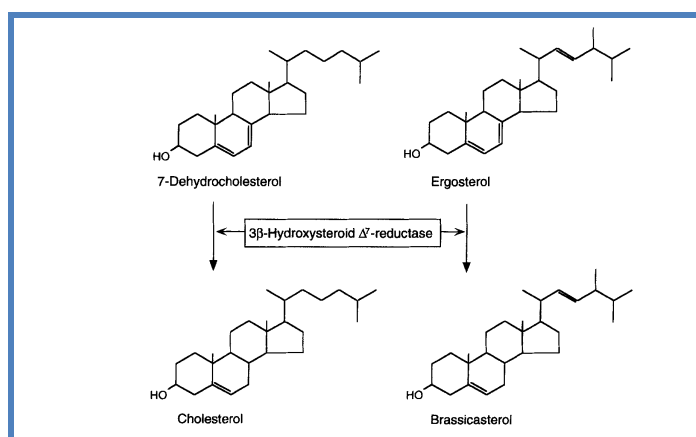


Figura A.1. Estrutura do 7-deidrocolesterol, colesterol, ergosterol e brassicasterol. O 7-deidrocolesterol e ergosterol são convertidos a colesterol e brassicasterol, respectivamente, pela 7-deidrocolesterol reductase em fibroblastos e amniócitos (adaptado de Honda *et al.*, 1996).

O facto do ergosterol e o brassicasterol não serem produtos do metabolismo dos mamíferos, permite distingui-los dos esteróis endógenos. Assim, é possível identificar, separar e quantificar estes esteróis, com o uso de um método cromatográfico, e desta forma, avaliar a actividade da enzima 7-deidrocolesterol reductase (DHCR7) em culturas de células humanas, uma vez que esta enzima converte o 7-DHC em colesterol e aceita como substrato alternativo o ergosterol, transformando-o em brassicasterol.

A.3. Optimização do método cromatográfico

Para a implementação do método cromatográfico com vista à separação e detecção de ergosterol, brassicasterol, 7-DHC e colesterol entre outros esteróis em amostras biológicas, procedeu-se inicialmente a uma optimização do método cromatográfico com base na bibliografia disponível (Rizzo *et al.*, 2000; Shan and Wilson, 2002; Curino *et al.*, 1998; Moraes *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2001; Galvão *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2002; Riddle and Guiochon, 2006) e a adaptações metodológicas adequadas aos procedimentos previamente descritos. O sistema cromatográfico utilizado é composto por um HPLC (*Lachrom, Merck Hitashi*), por um detector diode-array” (DAD) (*Hitachi*, modelo L-7455) e por um computador com software de controlo (*HSM-system 1*).

Os objectivos presentes à optimização do método de HPLC foram:

- Utilizar um método de fase reversa;

- Usar uma fase móvel simples e uma coluna disponível no laboratório – eluição isocrática;
- Taxas de fluxo pequenas;
- Temperatura inferior a 35°C;
- Volume de injeção pequeno;
- Ter um método selectivo e sensível para a detecção dos esteróis: ergosterol, brassicasterol, colesterol e 7-DHC;

Foram feitos vários ensaios variando os parâmetros analíticos tais como: diferente composição da fase móvel e variação da temperatura e do fluxo (com conseqüente variação da pressão).

Após as várias experiências, seleccionaram-se as seguintes condições:

- Método cromatográfico de fase reversa;
- Coluna C-18, 5 µm;
- Eluição isocrática onde se utiliza uma fase móvel de metanol/água 100:4;
- Tempo de corrida 40 minutos;
- Temperatura 30°C;
- Taxa de fluxo: 1 ml/min.;
- Volume de injeção da amostra: 100µl;
- Detector DAD com variação do comprimento de onda entre 200-400 nm e com comprimento de onda fixo nos 210nm.

A.4. Material e equipamento

➤ Material

- ✓ Adaptadores de pequeno volume, “insert” de vidro;
- ✓ Filtros *millipore*® de 4mm (0,45 µm) (*Millex*®-LH, ref. SLLHR04NL);
- ✓ Micropipetas de 100, 200 µl e 1000 µl;
- ✓ Pipeta de 5ml;
- ✓ Pipetas de vidro;
- ✓ Tetinas;

- ✓ Seringas de 2ml com agulhas;
- ✓ Suportes para tubos e vials;
- ✓ Tubos de vidro de 10ml com rolha para extracção de lípidos;
- ✓ Tubos de vidro de 10ml de fundo cónico;
- ✓ “Vials” de vidro de 2mL (frascos de colocação da amostra no injector automático).

➤ **Equipamento**

- ✓ Agitador automático (*Multi Tube Vortexer*, modelo VX-2500);
- ✓ Balança (*Mettler Toledo*, modelo XS205);
- ✓ Banho de água (*Memmert*, modelo WNB 7-45);
- ✓ Centrífuga (*Heraeus Instruments*, Labofuge 400e);
- ✓ Coluna de HPLC *Lichrospher®* RP-18, 250/4 cm, 5µm;
- ✓ Detector “diode-array” (DAD) (*Hitachi*, modelo L-7455);
- ✓ Estufa (*Heraeus Instruments D-6450 Hanau*, modelo T6060);
- ✓ Evaporador com fluxo de azoto (*Techne*, modelo FSC 4000);
- ✓ Excicador;
- ✓ Hotte;
- ✓ Aparelho HPLC (*Lachrom, Merck Hitashi*) e computador com software de controlo (*HSM-system 1*);
- ✓ Injector automático de GC/MS (*AOC-20i, Shimadzu*);
- ✓ Sistema de filtragem da fase móvel (*E.M.G.*, modelo 63/2);
- ✓ Vortex (*Heidolph*, modelo Deax 2000).

A.5. Reagentes e soluções

- ✓ Azoto (grau de pureza 99,999%);
- ✓ Etanol absoluto (*Panreac*, ref. 121086.1212): fornecido em frascos de 2.5L;
- ✓ Etanol a 96%: mediu-se 4mL de H₂O destilada e adicionou-se 96mL de etanol absoluto, de modo a fazer um volume final de 100mL;
- ✓ KOH (*Merck*, ref. 6498): fornecido em pastilhas e em frasco de 1kg;
- ✓ Solução 4% de KOH em etanol a 96%: Pesou-se 4g de KOH e adicionou-se 4ml de H₂O. Aqueceu-se ligeiramente sob agitação e adicionou-se em volumes reduzidos, 96 ml de etanol até se perfazer o volume final de 100ml;

- ✓ n-Hexano pro-análise (*Merck*, ref. 1.04367.1000): fornecido em frascos de 1L;
- ✓ Metanol para HPLC (*VWR*, ref.0502679): fornecido em frascos de 2.5L;
- ✓ H₂O destilada;
- ✓ H₂O para HPLC (*VWR*, ref. 0604270): fornecida em frascos de 2.5L;
- ✓ Brassicasterol (*Sigma*, ref. B4936): fornecido em frascos de 5mg e armazenado a 2-8°C;
 - Solução de Brassicasterol 500µM: adicionaram-se 1.99mg de brassicasterol a um volume de 10ml de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a - 20°C;
- ✓ Ergosterol (*Sigma*, ref. 45480): fornecido em frascos de 10g e armazenado a 4°C;
 - Solução de Ergosterol de 500 µM: adicionaram-se 10mg de ergosterol a um volume de 50 ml de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a - 20°C;
- ✓ 7-dehidrocolesterol (*Sigma*, ref. D-4429): fornecido em frascos de 1g e armazenado a 0°C;
 - Solução de 7-dehidrocolesterol 1mM: adicionaram-se 19.23mg de 7-dehidrocolesterol a um volume de 50mL de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a - 20°C;
- ✓ Colesterol (*Sigma*, ref. C-8667): fornecido em frascos de 1g e armazenado a 0°C;
 - Solução de Colesterol 1mM: adicionaram-se 19.33mg de colesterol a um volume de 50mL de etanol a 96% e deixou-se a agitar lentamente até dissolver. Armazenar a - 20°C;
- ✓ Fase móvel 100:4 de metanol/H₂O (filtrada e degaseificada).

A.5.1. Preparação dos padrões diluídos

A partir das soluções concentradas de ergosterol e brassicasterol (500µM), 7-DHC e colesterol (1mM) e usando a fase móvel para diluir, prepararam-se misturas com todos os esteróis de concentrações de 250, 125, 63, 31, 16 e 8µM. Preparam-se também padrões isolados para cada esterol com concentrações para o ergosterol e brassicasterol de 250, 125, 63, 31, 16 e 8µM e para o colesterol e 7-DHC de 333, 167, 83, 42, 21 e 10µM, que serviram de base para a curva de calibração e para os ensaios de determinação da sensibilidade do método.

A.6. Procedimento

Para **avaliar a actividade da enzima DHCR7** em culturas de células a metodologia é constituída por:

1. Preparação das amostras e dos padrões;
2. Lise celular, hidrólise, extração de lípidos e obtenção de extracto seco;
3. Análise por HPLC.

A.6.1. Preparação das amostras para HPLC

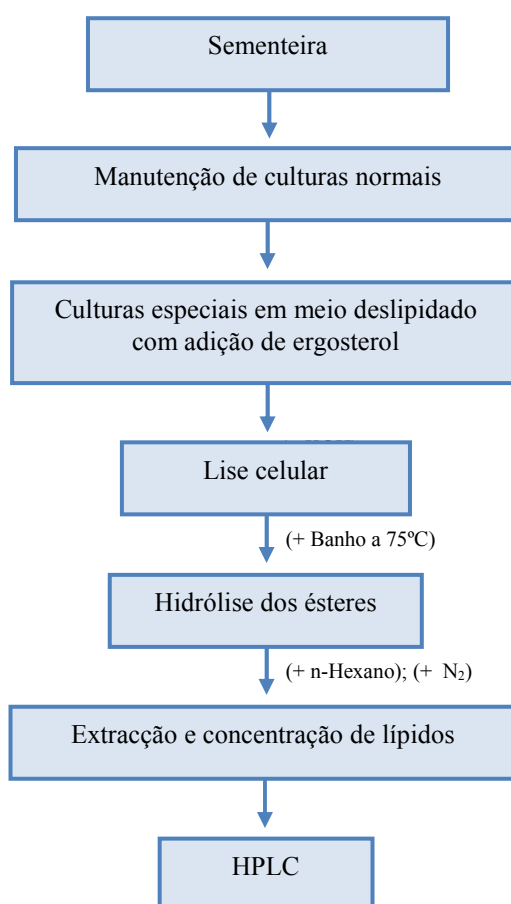


Figura A.2. Representação esquemática das diversas etapas necessárias para o doseamento enzimático da 7-dehidrocolesterol reductase e doseamento de ergosterol, brassicasterol, colesterol e 7-DHC até ao ensaio de HPLC.

A.6.2. Análise por HPLC

Antes de se efectuar uma análise por HPLC é necessário equilibrar a coluna com a fase móvel. A coluna C-18 foi sempre deixada a equilibrar de um dia para o outro. As amostras e os padrões foram colocados no prato do injector automático. Foi feito um “batch”

(lista de injeção) no menu correspondente do Software HSM-system 1 e dada ordem de arranque, quando se observou estabilidade da linha de base (nenhuma variação no ruído de fundo). A análise foi efectuada segundo as condições descritas em A.3. Os cromatogramas obtidos foram analisados e recorreu-se à integração automática, feita pelo Software, para determinar as áreas dos vários picos.

A.7. Resultados

A.7.1. Cromatogramas

Para identificar e determinar os tempos de retenção dos diferentes esteróis de uma amostra, analisou-se por HPLC cada um dos esteróis individualmente e uma mistura padrão de 125 μM , composta por ergosterol, brassicasterol, 7-DHC e colesterol, observando-se o seguinte cromatograma:

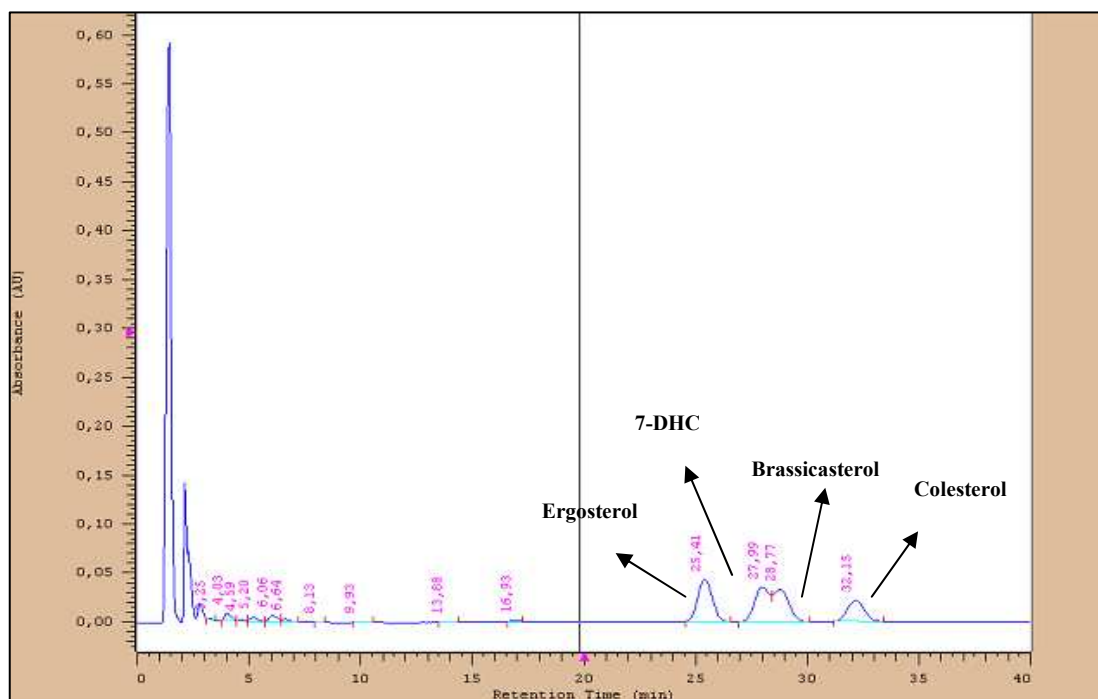


Figura A.3. Cromatograma característico de uma mistura de ergosterol, brassicasterol, 7-DHC e colesterol com concentração de 125 μM . O tempo de retenção do ergosterol é 25.41 min., do 7-DHC 27.99 min., do brassicasterol 28.77 min. e do colesterol 32.15 min.

A.7.2. Linearidade do método

Foram feitas curvas de calibração para o ergosterol, brassicasterol, 7-DHC e colesterol de forma a verificar a linearidade do método.

Tabela A.1. Áreas dos picos cromatográficos para as diferentes concentrações do padrão de ergosterol e brassicasterol.

Padrão de Ergosterol	
Concentração (μM)	Área dos picos
250	1988155
125	1003071
63	515820
31	270251
16	138612
8	73079

Padrão de Brassicasterol	
Concentração (μM)	Área dos picos
250	1147054
125	651083
63	329147
31	173081
16	90215
8	38799

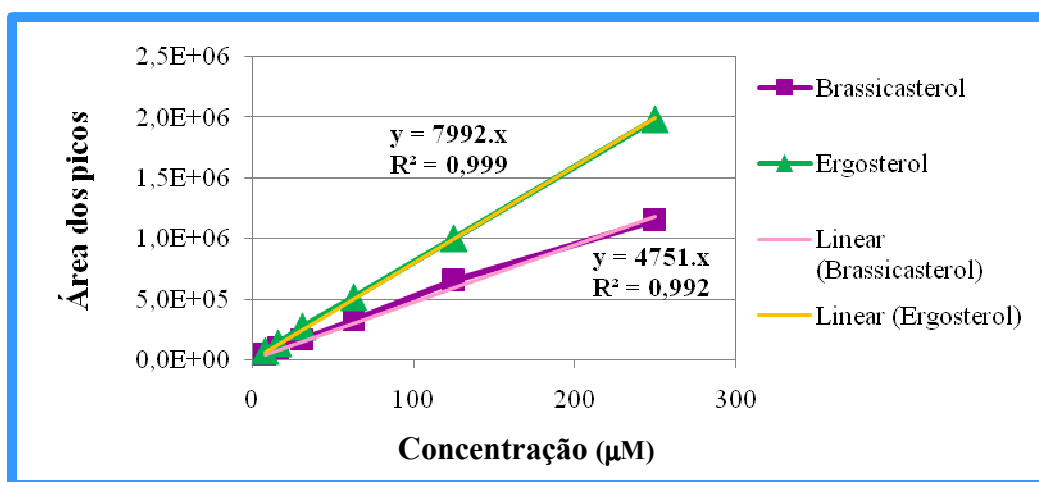


Figura A.4. Curvas de Calibração do ergosterol e brassicasterol para o intervalo de concentrações 8 - 250 μM . As linhas em verde e roxo correspondem aos resultados obtidos com as soluções padrão de ergosterol e brassicasterol, respectivamente. A linha amarela e a linha cor-de-rosa são as respectivas linhas de tendência para o ergosterol e brassicasterol. A equação da recta para o ergosterol é $y = 7992.x$ e o $R^2 = 0,999$. A equação da recta para o brassicasterol é $y = 4751.x$ e o $R^2 = 0,992$.

Tabela A.2. Áreas dos picos cromatográficos para as diferentes concentrações do padrão de colesterol e 7-dehidrocolesterol.

Padrão de Colesterol	
Concentração (µM)	Áreas dos picos
333	855036
167	472083
83	236279
42	110496
21	53391
10	25138

Padrão de 7-DHC	
Concentração (µM)	Áreas dos picos
333	1919200
167	1056206
83	551908
42	278948
21	148149
10	76775

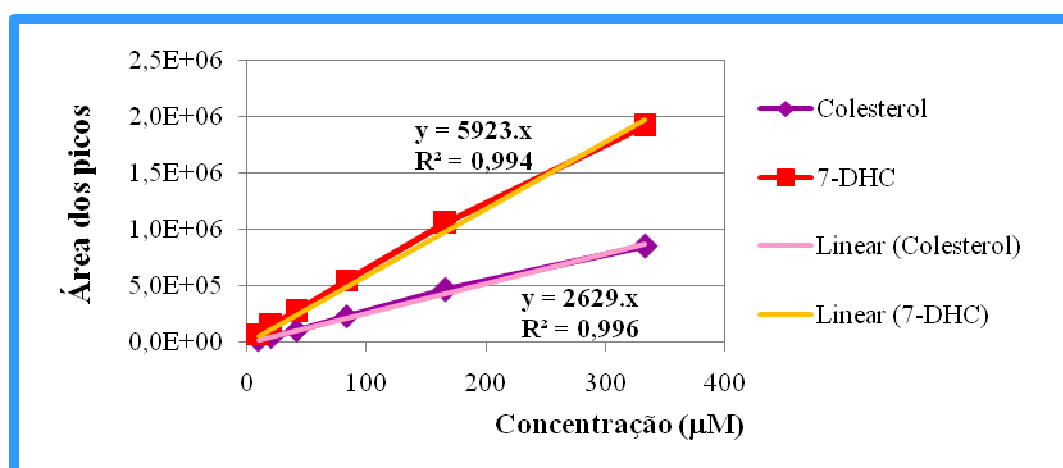


Figura A.5. Curvas de Calibração do colesterol e 7-DHC para o intervalo de concentrações 10 – 333µM. As linhas em vermelho e roxo correspondem aos resultados obtidos com as soluções padrão de colesterol e 7-DHC, respectivamente. A linha amarela e a linha cor-de-rosa são as respectivas linhas de tendência para o colesterol e 7-DHC. A equação da recta para o colesterol é $y = 5923.x$ e o $R^2 = 0,994$. A equação da recta para o 7-DHC é $y = 2629.x$ e o $R^2 = 0,996$.

Para todos os esteróis testados, as curvas de calibração apresentaram um valor de R^2 praticamente igual a um, o que significa, que as curvas de calibração foram lineares como se comprova pelas linhas de tendência. Logo, o método é linear e a variação da concentração segue um padrão linear.

A.7.3. Repetibilidade e Reprodutibilidade

A determinação da repetibilidade foi feita repetindo 10 vezes o doseamento da mesma amostra (mistura dos padrões de ergosterol, brassicasterol, colesterol e 7-DHC com concentração de 125µM), no mesmo dia e sob as mesmas condições de ensaio. Para avaliar a repetibilidade calculou-se o coeficiente de variação intra-série.

A determinação da reprodutibilidade foi feita com vários ensaios para a mesma amostra mas em dias diferentes. Para avaliar a reprodutibilidade calculou-se o coeficiente de variação inter-série.

O cálculo das concentrações dos padrões de esteróis foi feito por interpolação à recta de calibração de cada esterol, utilizando a respectiva equação. No entanto, dada à linearidade do método, não é necessário recorrer sempre à curva de calibração para se determinar a concentração dos compostos, podendo também ser utilizada uma fórmula e fazendo sempre correr em cada série uma mistura de padrões de concentrações conhecidas.

Fórmula para o cálculo das concentrações de diferentes compostos:

$$\text{Concentração } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Área amostra}}{\text{Área do Padrão}} \times \text{Concentração do padrão } (\mu\text{M})$$

Os valores para determinar a repetibilidade e a reprodutibilidade do método são apresentados nas tabelas A.3. e A.4., respectivamente.

Tabela A.3. Valores obtidos para a repetibilidade de todos os esteróis.

Repetições	Áreas dos picos				Concentrações calculadas			
	Ergosterol	Brassicasterol	7-DHC	Colesterol	Ergosterol	Brassicasterol	7-DHC	Colesterol
1	1020752	705191	702919	574382	127.72	148.42	118.68	218.48
2	1048425	715047	699633	570255	131.18	150.49	118.12	216.91
3	1040943	711425	708187	581810	130.25	149.73	119.57	221.30
4	1054117	723529	703745	575993	131.89	152.28	118.82	219.09
5	1043011	710893	707207	573241	130.50	149.62	119.40	218.05
6	1035041	728870	712045	576608	129.50	153.40	120.22	219.32
7	1043341	709076	708014	580915	130.55	149.23	119.54	220.96
8	1044668	712123	709637	578134	130.71	149.87	119.81	219.91
9	1055858	724180	711469	574601	132.11	152.41	120.12	218.56
10	1034531	714175	708431	577930	129.44	150.31	119.61	219.83
Parâmetros								
Média	1042069	715450.9	707128.7	576386.9	130.39	150.58	119.38	219.24
Desvio Padrão	-	-	-	-	1.28	1.59	0.66	1.33
Coef. Variação (%)	-	-	-	-	0.6	0.7	0.7	0.6

Legenda: Coef. Variação = Coeficiente de Variação intra-série.

Tabela A.4. Valores obtidos para a reprodutibilidade de todos os esteróis.

Repetições	Áreas dos picos				Concentrações calculadas			
	Ergosterol	Brassicasterol	7-DHC	Colesterol	Ergosterol	Brassicasterol	7-DHC	Colesterol
1	1042069	715450.9	718090	575148	130.39	150.58	121.24	218.77
2	1149395	718893	725464	592849	143.82	151.30	122.48	225.50
3	1363176	935078	722725	587084	170.57	196.80	122.02	223.31
4	1381711	940746	716466	601428	172.88	198.00	120.96	228.77
5	1381186	926532	667213	573658	172.82	195.01	112.65	218.20
6	1416207	941973	693328	592044	177.20	198.26	117.06	225.20
7	1407070	944177	695227	583489	176.06	198.72	117.38	221.94
8	1409327	942381	685453	585902	176.34	198.34	115.73	222.86
9	1211880	824511	721989	605267	151.63	173.53	121.90	230.23
10	1375218	872140	716738	610530	172.07	183.56	121.01	232.23
Parâmetros								
Média	1313723.9	876188.2	706269.3	590739.9	164.38	184.41	119.24	224.70
Desvio Padrão	-	-	-	-	16.42	19.44	3.32	4.65
Coef. Variação (%)					10.0	10.5	2.7	2.1

Legenda: Coef. Variação = Coeficiente de Variação inter-série.

O coeficiente de variação intra-série e inter-série foi: 0.59% e 9.99% para o ergosterol, 0.69% e 10.54% para o brassicasterol, 0.61% e 2.07% para o colesterol e 0.55% e 2.70% para o 7-DHC, respectivamente.

Como para todos os esteróis, os coeficientes de variação intra-série e inter-série foram próximos e inferiores a 10%, havendo mesmo alguns casos com valores próximos de 1%, isto indica que, este método mostrou ter uma boa repetibilidade intra-série e uma boa reprodutibilidade inter-série.

A.7.4. Cromatogramas de extractos celulares

Numa amostra de extractos celulares de um indivíduo normal visualiza-se no cromatograma os picos de colesterol, ergosterol e brassicasterol.

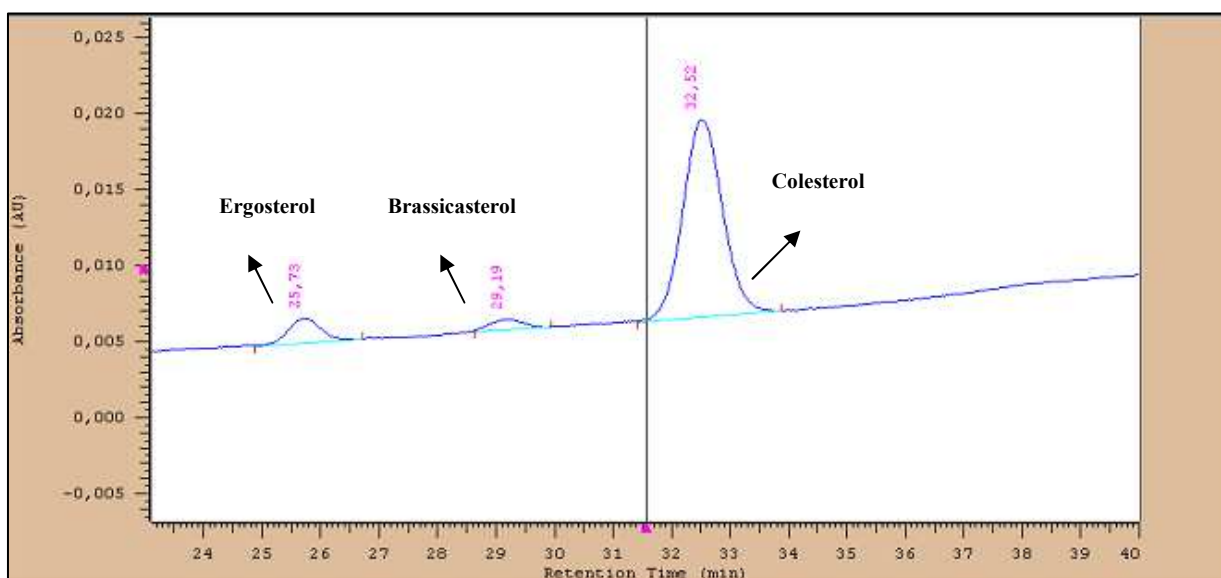


Figura A.6. Cromatograma característico de um **Controlo Normal**. O tempo de retenção do ergosterol é aos 25.73 min., do brassicasterol 29.19 e do colesterol aos 32.52 min.

Numa amostra de extractos celulares de um indivíduo com a patologia Síndrome Smith-Lemli-Opitz (SLO) visualiza-se no cromatograma os picos de colesterol, ergosterol e 7-DHC.

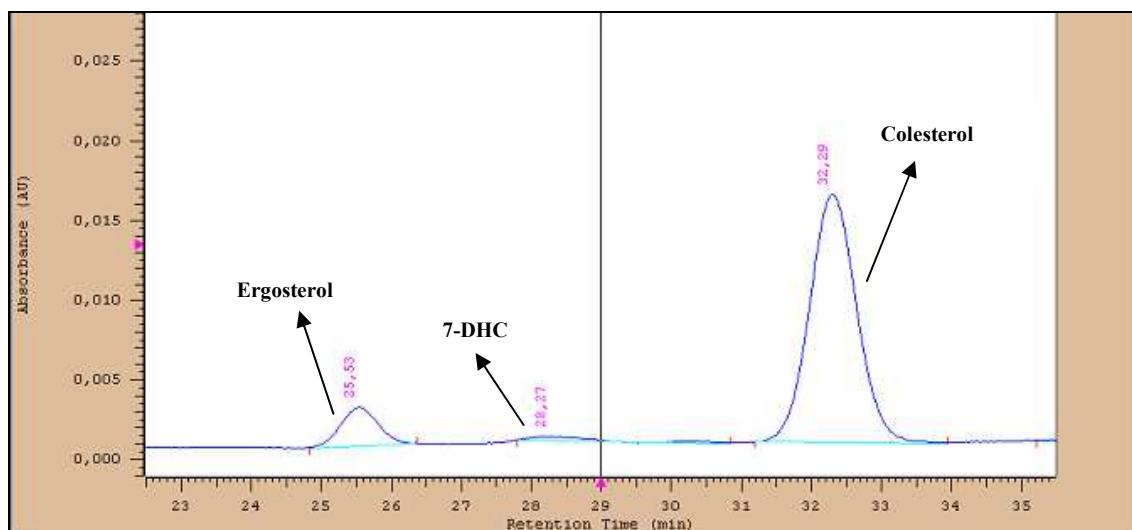


Figura A.7. Cromatograma característico de um doente com Síndrome Smith-Lemli-Opitz (SLO). O tempo de retenção do ergosterol é aos 25.53 min., do 7-DHC 28.27 e do colesterol aos 32.29 min.

O método de HPLC otimizado mostrou ser linear, ter uma boa repetibilidade intra-série e reprodutibilidade inter-série na quantificação de diversos esteróis.

Este método para além de permitir a deteção, identificação e quantificação de diversos esteróis, permite a avaliação da actividade da enzima DHCR7 em culturas celulares humanas, através da quantificação da conversão do substrato ergosterol a brassicasterol. No caso de um doente com patologia SLO (figura A.7.), uma vez que a enzima DHCR7 está em défice, não há conversão de 7-DHC em colesterol, nem de ergosterol a brassicasterol, num indivíduo normal (figura A.6.), como há actividade enzimática da DHCR7, à conversão de ergosterol a brassicasterol e de 7-DHC a colesterol. A quantificação destes compostos num cromatograma permite a confirmação/exclusão de um diagnóstico de SLO a partir de culturas celulares.

A.8. Conclusão

O método HPLC-DAD otimizado (HPLC de fase reversa com coluna C-18, eluição isocrático e detector DAD) permite a quantificação de colesterol, 7-DHC, ergosterol e brassicasterol em extractos celulares e desta forma, permite o diagnóstico da síndrome Smith-Lemli-Opitz, por avaliação da actividade enzimática da 7-dehidrocolesterol reductase (DHCR7). Este método mostrou ser linear, ter uma boa repetibilidade e reprodutibilidade para

todos os esteróis quantificados. A avaliação da actividade da enzima DHCR7 pelo método HPLC-DAD optimizado e validado permite a confirmação/exclusão de um diagnóstico para a síndrome Smith-Lemli-Opitz, utilizando um método não invasivo e nocivo, uma vez que, não é aplicado nas culturas de células, substratos para enzima marcados radioactivamente mas sim, um substrato natural, o ergosterol.

No final deste Anexo A é apresentado um Poster “**A new HPLC-DAD method for sterols analysis in biological fluids**”, exposto, no dia 18 de Janeiro de 2008, no 3.º Workshop de Bioquímica Clínica - “Doenças emergentes no século XXI”, organizado pela Sociedade Portuguesa de Bioquímica.

A.9. Bibliografia

Castro, M.F.; Bragagnolo, N.; Leitão, M.F.F.; Molina, C.M.; Alves, A.B. (2001). “Determinação de ergosterol por cromatografia líquida de alta eficiência, em milho em grãos com diferentes níveis de contaminação fúngica.” *J. Food Technol.*; 4: 49-55.

Curino, A.; Skliar, M.; Boland, R. (1998). “Identification of 7-DHC, vitamin D₃, 25(OH)-vitamin D₃ and 1,25(OH)₂- vitamin D₃ in *Solanum glaucophyllum* cultures grown in absence of light.” *Biochimica et Biophysica Acta*; 1425: 485-492.

Fernández, C.; Suarez, Y.; Ferruelo, A.J.; Gómez-Coronado, D.; Lasunción, M.A. (2002). “Inhibition of cholesterol biosynthesis by Δ^{22} -unsaturated phytosterols via competitive inhibition of sterol Δ^{24} -reductase in mammalian cells.” *Biochem. J.*; 366: 109-119.

Galvão, J.G.; Guerreiro, M.C.; Souza, J.A.; Coura, S.M.C. (2003). “Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de ametrina, através da medida de biomassa, pela quantificação do ergosterol.” *Cien. Agro.*; 27: 840-845.

Honda, M.; Tint, G.S.; Honda, A.; Batta, A.K.; Chen, T.S.; Shefer, S.; Salen, G. (1996) “Measurement of 3 β - hydroxysteroid Δ^7 -reductase activity in cultured skin fibroblasts

utilizing ergosterol as a substrate: a new method for the diagnosis of the Smith - Lemli -Opitz syndrome.” *J. Lipid Res.*; 37: 2433-2438.

Moraes, R.J.Q.; Almeida, C.A.A.; Dilkin, P.; Kowalski, C.H.; Murmann, L; Mallmann, C. A. (2003). “Dosagem de ergosterol como indicador de contaminação fúngica em milho armazenado.” *Arq. Inst. Biol.*; 70: 483-489.

Shan, H.; Wilson, W.K. (2002). “Ternary gradient elution markedly improves silver-ion high performance liquid chromatography of unsaturated sterols.” *Steroids*; 67: 917-923.

Shefer, S.; Salen, G.; Honda, A.; Batta, A.K.; Nguyen, L.B.; Tint, G.S.; Ioannou, Y.A. e Desnick, R. (1998) “Regulation of rat hepatic 3 β -hydroxysterol Δ^7 -reductase: substrate specificity, competitive and non-competitive inhibition, and phosphorylation/dephosphorylation.” *Journal of Lipid Research*; 39: 2471-2476.

Riddle, L.A.; Guiochon, G. (2006). “Separation of free sterols by high temperature liquid chromatography.” *J. of Chromatography A*; 1137: 173-179.

Rizzo, C.; Dionisi-Vici, C.; D’Ippoliti, M.; Fina, F.; Sabetta, G.; Federi; G. (2000). “A simple and rapid HPLC method for simultaneous determination of plasma 7-DHC and vitamin E: its application in SLO.” *Clinica Chimica Acta*; 291: 97-102.

Waterham, H.R.; Wanders, R.J.A. (2000). “Biochemical and genetics aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith- Lemli-Optiz syndrome.” *Biochimica et Biophysica Acta*; 1529: 340-356.