



Doenças do metabolismo do colesterol: cromatografia de esteróis no diagnóstico de 25 casos em Portugal

Cholesterol synthesis defects: sterol analysis in the diagnosis of 25 Portuguese patients

Carla Valongo, Aureliano Jorge Dias, Mónica Sofia Leite, Laura Vilarinho

laura.vilarinho@insa.min-saude.pt

Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

_Resumo

Os esteróis desempenham um papel fundamental nos processos fisiológicos de praticamente todos os organismos vivos. O esterol mais abundante nos seres humanos é o colesterol, o qual desempenha uma multiplicidade de funções desde a estrutural à sinalização. A extração e análise de esteróis no plasma é complexa devido à sua insolubilidade, sequestração dentro das lipoproteínas e à grande diferença entre cada tipo de esterol. Os autores apresentam a casuística referentes à análise de 13 esteróis e fitosteróis em plasma e líquido amniótico.

_Abstract

Sterols play essential roles in the physiological processes of virtually all living organisms. In Man, the most abundant sterol is cholesterol, which has a myriad of functions in biology, ranging from structural to signaling. The extraction and analysis of sterols in human plasma present a unique challenge due to their virtual insolubility, sequestration within lipoproteins, and dramatic differences in the levels of individual sterols. We present our positive results of the analysis of 13 sterols and phytosterols from human plasma and amniotic fluid in a single GC-MS run.

_Introdução

O colesterol é o principal lípido encontrado nas células de mamíferos (1). Para além de desempenhar um papel estrutural nas membranas celulares e na bainha de mielina é também um precursor de vários compostos tais como ácidos biliares, oxisteróis, neuroesteróis, glucocorticoides, mineralocorticoides e hormonas sexuais (testosterona e estrogénio). O colesterol encontra-se igualmente envolvido no ciclo celular, na sinalização durante o desenvolvimento embrionário e, devido à variedade de funções biológicas atribuídas ao colesterol, a sua depleção durante a gravidez provoca consequências graves no desenvolvimento fetal (2,3).

Na literatura, diferentes estudos têm demonstrado que várias síndromes malformativas humanas são devidas a mutações genéticas que envolvem enzimas da biossíntese do colesterol e são caracterizadas pela acumulação de níveis anormais de esteróis nos fluídos biológicos e tecidos, nomeadamente: síndrome de Smith-Lemli-Opitz; desmosterolose; síndrome de Conradi-Hünemann-Happle (Condrodisplasia punctata tipo 2 dominante ligada ao X) e latosterolose. Outras Doenças Hereditárias do Metabolismo envolvidas nos defeitos de absorção e catabolismo do colesterol estão igualmente descritas, nomeadamente a sitosterolinemia e a xantomatose cerebrotendinosa (quadro 1) (4-9).

Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS, MIM #270400): É a doença metabólica da biossíntese do colesterol mais frequente e melhor caracterizada, descrita pela primeira vez em 1964 e com uma incidência estimada de 1/10.000 a 1/60.000 recém-nascidos vivos (8).

Desmosterolose (MIM #602398): Desta patologia encontram-se descritos na literatura apenas três casos, todos com diferente apresentação clínica (9-10). O quadro clínico é sobreponível com a SLOS e até à data não existe tratamento eficaz para a desmosterolose (9).

Síndrome de Conradi-Hünemann-Happle (CDPX2, MIM #302960): A CDPX2 tem uma hereditariedade ligada ao cromossoma X e é frequentemente letal nos indivíduos do sexo masculino. O fenótipo nos doentes afetados do sexo feminino é extremamente variado, podendo os casos mais graves ser incompatíveis com a vida devido a alterações esqueléticas

Quadro 1: ⚓ Erros inatos da síntese, absorção e catabolismo do colesterol diagnosticados pela cromatografia de esteróis (5-10).

Patologia	Enzima/proteína deficitária	Gene, Cromossoma e Modo transmissão	Cromatografia de esteróis	Clínica
CDPX2	3β-hidroxiesterol Δ8-Δ7 isomerase	<i>EBP</i> Xp11.22-23 AD, ligada ao X	↑8(9)-colestenol ↑8-DHC N-↓Colesterol	Alterações cutâneas (eritoderma ictiforme no recém-nascido, lesões lineares, atróficas e pigmentares em criança e hiperqueratose estriada e alopecia em adultos), cataratas e alterações esqueléticas (baixa estatura, encurtamento assimétrico dos ossos longos, baixa estatura, escoliose, calcificações da traqueia, laringe e epífises dos ossos longos e alterações crânio-faciais).
Desmosterolose	3β-hidroxiesterol Δ24 redutase	<i>DHCR24</i> 1p3.1-33 AR	↑Desmosterol N-↓Colesterol	Malformações congénitas múltiplas esqueléticas e do SNC (macrocefalia, ponte nasal hipoplástica, nódulos gengivais, fenda palatina, ambiguidade sexual, encurtamento dos membros e osteoclerose generalizada, dismoria facial, microcefalia, e atraso de desenvolvimento profundo).
Latosterolose	3β-hidroxiesterol Δ5 insaturase	<i>SC5D</i> 11q23.3 AR	↑Latosterol N-Colesterol	Microcefalia grave, testa ampla, narinas antevertidas, micrognatia, lábio superior proeminente, palato arqueado, hexadactilia pós-axial do pé direito e sindactilia entre o 2º e 4º dedo e entre o 5º e um extra. Desde a infância com doença hepática colestática e atraso de desenvolvimento psicomotor grave.
SLO	3β-hidroxiesterol Δ7 redutase	<i>DHCR7</i> 11q12-13 AR	↑7-DHC ↑8-DHC N-↓↓Colesterol	Microcefalia, narinas antevertidas, queixo pequeno, micrognatia, fenda palatina ou úvula bífida, esteatose do piloro, cataratas, ptose, estrabismo, nistagmo, fotossensibilidade, rizomelia e polidactilia pós-axial das mãos ou dos pés, sindactilia dos 2º e 3º dedos dos pés e polegares de implantação proximal e curtos. Anomalias genitais, cardiovasculares, gastrointestinais, pulmonares e renais. Atraso de desenvolvimento profundo pré e pós-natal, atraso mental, ascite neonatal, icterícia colestática, fotossensibilidade, múltiplos traços autistas, hiperatividade, comportamento auto-agressivo e perturbações do sono.
CTX	esterol 27-hidroxilase	<i>CTX</i> 2q35 AR	↑Colestanol N-Colesterol	Icterícia colestática, cataratas, atraso mental na infância. Alterações motoras e xantomas tendinosos na 2ª ou 3ª década de vida. Arteriosclerose prematura que pode levar à morte de alguns doentes devido a enfarte do miocárdio. Noutros casos a doença neurológica progressiva torna-se letal.
β-sitosterolemia	transportador heterodimérico ABCG5/G8	<i>ABCG5/ ABCG8</i> 2p21 AR	↑β-sitosterol(nol), ↑Campesterol(nol), ↑Estigmasterol N-↑Colesterol	Xantomas tuberosos e tendinosos, doença cardiovascular, arteriosclerose precoce. Alterações hemolíticas (anemia, hemólise esporádica, reticulatose, estomatose e macrotrombocitopenia). Artrite, esplenomegalia e dor abdominal

AD- transmissão autossómica dominante; AR- transmissão autossómica recessiva, CDPX- síndrome de Conradi-Hünemann-Happle ligada ao X dominante; CTX- xantomatose cerebrotendinosa; N- Normal; SLO- síndrome de Smith-Lemli-Opitz; ↑- aumento; ↓- diminuição

e internas graves. Com uma incidência estimada inferior a 1/400.000 nados-vivos a qual poderá estar subestimada devido à dificuldade de diagnóstico dos casos mais ligeiros bem como aos possíveis diagnósticos incorretos (10).

Latosterolose (MIM #607330): O primeiro caso a ser diagnosticado foi em 2002 por Burnett-Pierrri e colaboradores, e apenas se encontram descritos na literatura quatro casos (8). A apresentação clínica assemelha-se à SLOS podendo, por vezes, levar a erros de diagnóstico.

Sitosterolinemia (fitosterolinemia, MIM #210250): É uma doença rara da captação e armazenamento de esteróis originando um aumento da absorção dietética de colesterol e esteróis vegetais, associado à incapacidade hepática em excretar esses esteróis pela biliar (5,6). Estudos recentes demonstraram que as alterações hematológicas características da sitosterolinemia podem estar subvalorizadas, podendo até esta doença ser confundida com outros tipos de trombocitopenia crónica, corroborando o conceito de que a fitosterolinemia pode não ser tão rara quanto se estima (5). A terapêutica disponível passa por uma restrição alimentar em fitosteróis e marisco, compostos sequestrantes de ácidos biliares (colesteramina) e inibidores da absorção de esteróis (ezetimibe), esta última tem-se revelado bastante promissora (5,6).

Xantomatose cerebrotendinosa (CTX, MIM #213700): A CTX, doença rara do metabolismo dos sais biliares, é caracterizada pela acumulação de colesterol e colestanol nos fluidos biológicos e tecidos (7).

Estudos apontam que a idade média de doentes diagnosticados com CTX é de 35 anos e o diagnóstico definitivo demora cerca de 16 anos. O diagnóstico precoce e o tratamento a longo prazo com ácido quenodeoxicólico (750 mg/d) podem trazer melhorias a nível dos sintomas neurológicos e contribuir para um prognóstico favorável (7).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) tem sido a técnica de eleição na análise de esteróis plasmáticos. A sua aplicabilidade ao líquido amniótico (LA) e às vilosidades coriônicas permite o diagnóstico pré-natal de SLOS (2).

_Objetivo

No presente trabalho é evidenciada a importância da cromatografia de esteróis no diagnóstico pré e pós-natal de Doenças Hereditárias do Metabolismo que afetam a biossíntese, absorção e catabolismo do colesterol, sendo apresentada a casuística referentes à análise de 13 esteróis e fitosteróis em plasma e líquido amniótico.

_Material e métodos

A análise é efetuada sobre amostras de sangue (plasma ou soro) e de LA proveniente de diferentes hospitais distribuídos em Portugal. O sangue é colhido para tubos contendo EDTA/heparina de lítio e posteriormente é centrifugado 10 min a 3500 rpm. O LA é centrifugado 10 min a 2000 rpm para remover todo o material celular e o respetivo sobrenadante é conservado a -20°C para posterior análise.

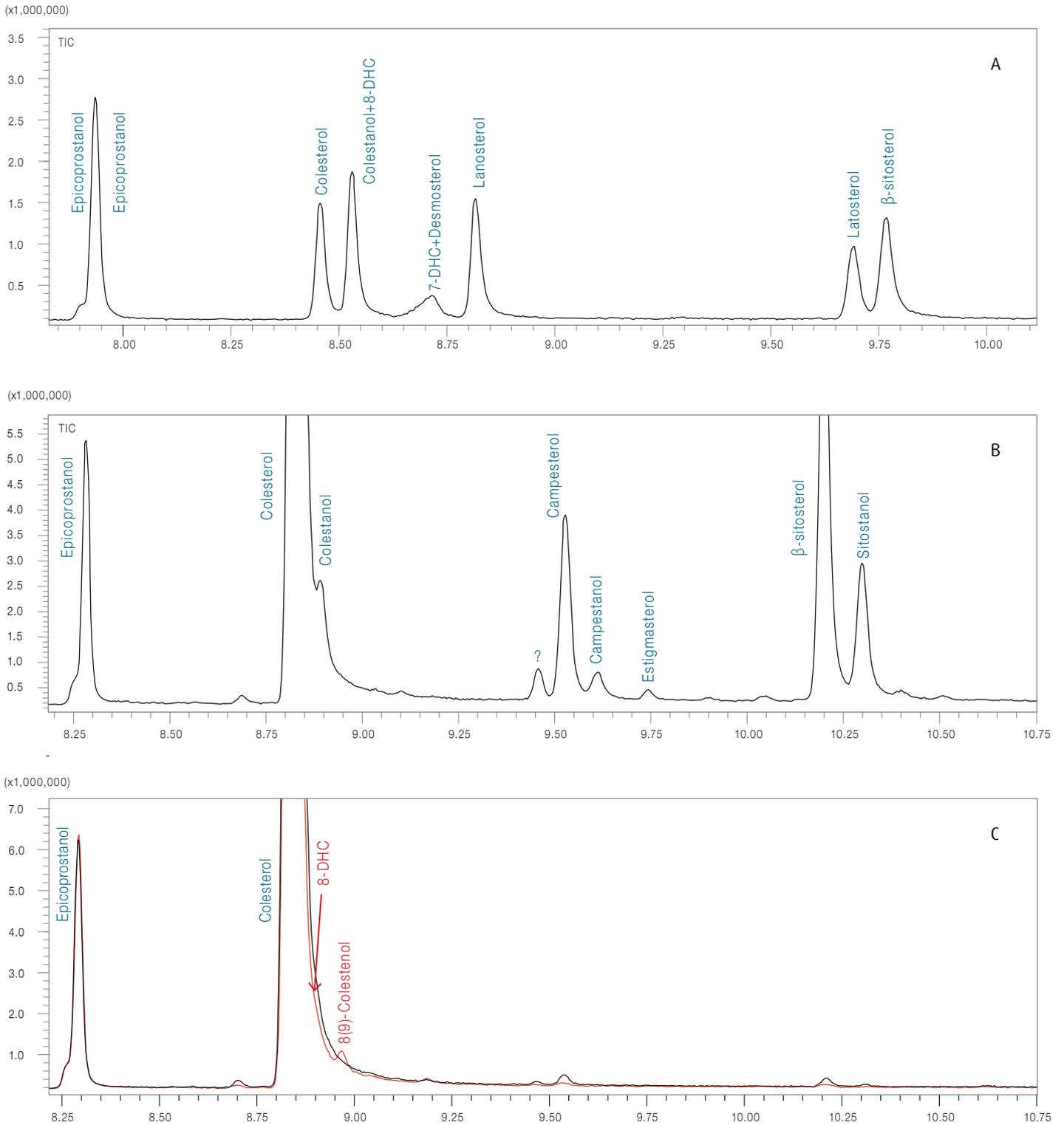
O método de extração e análise utilizado foi previamente descrito (2,11). O equipamento usado é um GC-MS-Fast QP2010Plus (Shimadzu Co., Duisburg, Alemanha) para a análise simultânea de sete produtos da biossíntese do colesterol (8-deidrocolesterol (8-DHC), 7-DHC, 8(9)-colestenol, desmosterol, lanosterol, latosterol e colesterol), um produto do catabolismo do colesterol (colestanol) e vários fitosteróis e fitostanois (b-sitosterol, campesterol, estigmasterol, sitotanol e campestanol) (figura 1).

_Resultados e discussão

Desde a implementação da cromatografia de esteróis para diagnóstico de doenças da biossíntese do colesterol, em 2002, foram identificados 25 doentes: 17 doentes com SLOS (15 diagnósticos pós-natal e dois de pré-natal), dois casos de CDPX2, sendo um deles do sexo masculino, cinco doentes com CTX e um caso de sitosterolinemia.

Para além das patologias descritas anteriormente, outro défice da síntese do colesterol foi também diagnosticado mas recorrendo a estudos moleculares como é o caso da síndrome de CHILD (Hemidisplasia Congénita com Eritrodermia Ictiosiforme) (4). Nas restantes doenças do metabolismo do colesterol que não dispõem de um marcador bioquímico patognomónico recorre-se a estudos genéticos de forma a confirmar/excluir a suspeita clínica como é o caso do síndrome de Antley-Bixley, síndrome CK, displasia de Greenberg, défice da oxidase dos C4-metilesteróis, para além do síndrome de CHILD.

Figura 1: Cromatografia de esteróis plasmáticos por CG-MS-Fast.



Epicoprostanol- padrão interno; 7-DHC- 7-dehidrocolesterol; 8-DHC- dehidrocolesterol.

A- Cromatograma de uma solução padrão de esteróis (10 μmol/L); B- Cromatograma de doente com sitosterolinemia; C- Comparação de perfis cromatográficos: traçado preto - perfil normal, traçado vermelho - perfil de doente com CDPX2.

Conclusões

A Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge disponibiliza, a nível nacional, o diagnóstico bioquímico e molecular dos erros inatos da síntese, absorção (fitosteróis) e catabolismo (via metabólica dos sais biliares) do colesterol.

A alta sensibilidade, que permite o uso de pequenos volumes de amostra, bem como um reduzido tempo de análise, corroboram o facto de a cromatografia de esteróis ser a abordagem preferencial na análise destes metabolitos em amostras biológicas.

Nestas doenças, a heterogeneidade fenotípica dificulta o seu reconhecimento pelo clínico, o que contribuiu para o subdiagnóstico deste grupo de patologias raras.

Referências bibliográficas:

- (1) Honda A, Yamashita K, Miyazaki H, et al. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J Lipid Res.* 2008;49(9):2063-73. www.jlr.org/content/49/9/2063.long
- (2) Amaral C, Gallardo E, Rodrigues R, et al. Quantitative analysis of five sterols in amniotic fluid by GC-MS: application to the diagnosis of cholesterol biosynthesis defects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(23):2130-6.
- (3) Cardoso ML, Bandeira A, Lopes A, et al. A síndrome de Smith-Lemli-Opitz: características fenotípicas e genotípicas dos doentes portugueses. *Acta Pediatr Port.* 2012;43(2):47-52. <http://actapediatrica.spp.pt/article/view/1100/893>
- (4) Cardoso ML, Barbosa M, Serra D, et al. Living with inborn errors of cholesterol biosynthesis: lessons from adult patients. *Clin Genet.* 2013;85(2):184-8.
- (5) Escolà-Gil JC, Quesada H, Julve J, et al. Sitosterolemia: Diagnosis, Investigation, and Management. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16:424.
- (6) Ajagbe BO, Othman RA, Myrie S B. Plant Sterols, Stanols, and Sitosterolemia. *J AOAC Int.* 2015;98(3):716-23. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4514516/
- (7) Nie S, Chen G, Cao X, et al. Cerebrotendinous xanthomatosis: a comprehensive review of pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:179. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4264335/
- (8) Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *Lipid Res.* 2011;52(1):6-34. www.jlr.org/content/52/1/6.long
- (9) Kanungo S, Soares N, He M, et al. Sterol metabolism disorders and neurodevelopment - an update. *Dev Disabil Res Rev.* 2013;17(3):197-210.
- (10) Herman GE, Kratz L. Disorders of sterol synthesis: beyond Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012;160C(4):301-21.
- (10) Cardoso ML, Balreira A, Martins E, et al. Molecular studies in Portuguese patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome and report of three new mutations in DHCR7. *Mol Genet Metab.* 2005;85(3):228-35.