
COMUNICACIÓN BREVE

Diagnóstico del síndrome Smith-Lemli-Opitz por cromatografía de capa fina.

Smith-Lemli-Opitz syndrome diagnosis through thin film chromatography.

Angel Alfonso Aquino Perna,^I Diana Martín García,^{II} Maida Rodríguez Carmona.^{III}

Resumen

El síndrome Smith-Lemli-Opitz es un error congénito del metabolismo del colesterol causante de malformaciones y retraso mental. El diagnóstico bioquímico consiste en la demostración del incremento del 7-dehidrocolesterol por cromatografía de gases/espectrometría de masa, tecnología que no siempre está disponible en los países en vías de desarrollo. Se propone un método de diagnóstico basado en la determinación cualitativa de esteroides por cromatografía de capa fina. El estudio en personas sanas no detectó la presencia del 7-dehidrocolesterol. En 21 pacientes con características clínicas de Smith-Lemli-Opitz se hicieron estudios por cromatografía de capa fina y por cromatografía de gases/espectrometría de masa y se diagnosticaron 10 pacientes, hubo una coincidencia total de los resultados por ambos métodos. En otros cuatro pacientes positivos por cromatografía de capa fina se identificaron las dos mutaciones causantes de la enfermedad. Los resultados avalan la utilidad del método propuesto para el diagnóstico del síndrome Smith-Lemli-Opitz.

Palabras clave: Síndrome Smith-Lemli-Opitz, error congénito del metabolismo, cromatografía de capa fina, diagnóstico, colesterol, 7-dehidrocolesterol.

Abstract

Smith-Lemli-Opitz syndrome is a cholesterol congenital metabolism error, causing malformations and mental handicap. Biochemical diagnosis demonstrates the increase of 7-dehydrocholesterol by gas chromatography/mass spectrometry techniques, not always available in countries in development. A diagnosis method based upon the qualitative sterols determination by thin film chromatography is proposed in this article. The study of healthy persons did not detect any 7-dehydrocholesterol. In 21 patients with clinical characteristics of the Smith-Lemli-Opitz syndrome, thin film chromatography and gas chromatography/mass spectrometry determinations were carried out, diagnosing 10 patients, with a total coincidence in the results produced by both methods. In four other patients, positive according to thin film chromatography, the two mutations causing the disease were identified. These results endorse the usefulness of the method proposed for diagnosing the Smith-Lemli-Opitz syndrome.

Keywords: Smith-Lemli-Opitz syndrome, congenital metabolism error, thin film chromatography, diagnosis, cholesterol, 7-dehydrocholesterol.

Introducción

El síndrome Smith-Lemli-Opitz Syndrome (SLO) (OMIM 270400)^I es una enfermedad autosómica recesiva causada por una deficiencia de la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa (7DHCR) que cataliza el último paso de la vía de síntesis del colesterol, por lo cual existen bajos niveles de colesterol y elevados del precursor 7-dehidrocolesterol (7DHC) y su isómero el 8-dehidrocolesterol (8DHC).² La

marca bioquímica del síndrome es la demostración de 7DHC elevado, por medio de cromatografía de gases/espectrometría de masa (CG/EM) u otras tecnologías disponibles en laboratorios especializados como espectrometría ultravioleta, cromatografía líquida/espectrometría de masa y cromatografía líquida/espectrometría de masa en tándem.³ La identificación de dos mutaciones en el gen DHCR7 también permite confirmar la enfermedad, pero la existencia de más de

^I Licenciado en Biología. Profesor Asistente. Centro Provincial de Genética Médica. Sancti Spiritus. Cuba.

^{II} Especialista de Segundo Grado en Genética Clínica. Profesor Auxiliar. Centro Provincial de Genética Médica. Sancti Spiritus. Cuba.

^{III} Licenciado en Tecnología de la Salud. Profesor Asistente. Centro Provincial de Genética Médica. Sancti Spiritus. Cuba.

130 mutaciones en diferentes exones y sus vecindades hacen que el diagnóstico molecular sea más complejo y costoso.⁴

El espectro fenotípico es amplio e incluye retraso mental y del desarrollo físico, microcefalia, dismorfia facial, anomalías genitales en los varones, sindactilia 2-3 de los pies y malformaciones de órganos internos. El tratamiento consiste en la suplementación de colesterol dietético o como preparado farmacológico, con el que se obtiene la mejoría de la calidad de vida de los pacientes.³⁻⁵

Los estimados de incidencia reportados en la literatura varían desde 1 en 10 000 hasta 1 en 70 000 nacimientos⁵ por lo que se incluye en el grupo de las conocidas como enfermedades raras, las cuales de manera individual no constituyen problemas de salud pública, por lo que son poco estudiadas resultando un serio problema para los pacientes y sus familiares más cercanos y en su conjunto para la sociedad.⁶ Usualmente no existen tratamientos efectivos y ni siquiera medios diagnósticos para su confirmación,^{7,8} esto podría ser especialmente notable en lugares alejados de las grandes ciudades o en países en vías de desarrollo donde hay limitaciones tecnológicas y dificultades para acceder a servicios especializados. En este trabajo se propone un método por cromatografía de capa fina (CCF) para la identificación cualitativa de valores incrementados de 7DHC, que nunca se ha usado con fines diagnósticos para esta enfermedad.

Métodos

Extracción de esteroides a partir de plasma sanguíneo
Los esteroides se extrajeron a partir de 500 µL de plasma sanguíneo por el método convencional que a continuación se describe. La muestra se saponificó con 6 mL de NaOH etanólico 1N, en baño de María a 60°C por una hora. Posteriormente se realizó la extracción con 6 mL de hexano (Merck), puede ser usado también éter de petróleo o pentano. Se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos, se colectó la fase superior y se lavó con agua destilada. Se centrifugó nuevamente a 1000 rpm, se tomó la fase orgánica y se dejó evaporar el solvente hasta sequedad bajo campana, cuidando no exponer la muestra a la luz intensa. Los esteroides extraídos se diluyeron en 100 µL de cloroformo hasta su uso.

Análisis por Cromatografía de capa fina (CCF)

Para la determinación cualitativa de los esteroides extraídos se procedió según métodos reportados^{9,10} con algunas modificaciones. Se prepararon placas de Silicagel 60 (Merck) activándolas por 1 hora a 100°C,

luego se impregnaron con 10 % de nitrato de plata (Sigma) en solución metanol:agua (1:1), se dejó secar al aire por 10 min y luego una hora a 100°C.

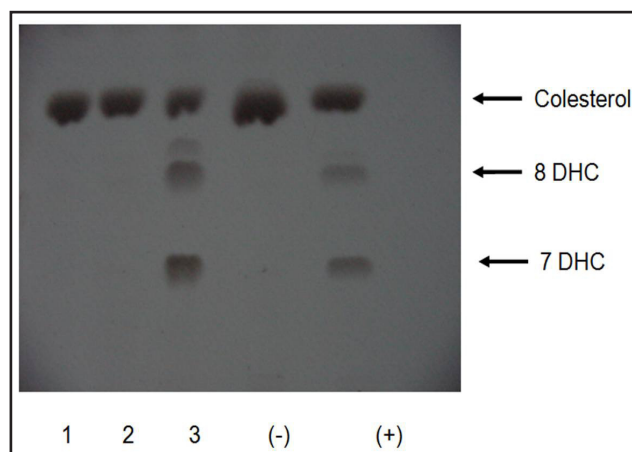
Se aplicaron 30 µL de la muestra. La corrida se realizó utilizando una mezcla solvente de cloroformo:acetona (85:15, vol/vol) a 4°C. El proceso se realizó en la oscuridad y el revelado se llevó a cabo mediante el tratamiento de las placas con H₂SO₄ al 20 %, aplicado como spray. Las placas se secaron al horno por 20 min a 100 °C.

El método se validó con 40 individuos sanos, sin antecedentes familiares de la enfermedad. Se estudiaron 21 pacientes con fenotipo sugestivo del síndrome Smith-Lemli-Opitz.

Resultados y Discusión

La CCF reveló en 10 de los pacientes con fenotipo sugestivo de síndrome Smith-Lemli-Opitz las bandas de corrida correspondientes a colesterol, 7DHC y 8DHC, con R_f de 0,73, 0,32 y 0,57 respectivamente; lo que coincidió con los resultados de la corrida del control positivo. En los controles solo se observó la banda de colesterol (Figura 1), lo que corresponde a un resultado negativo.

Figura 1. Resultado final de la Cromatografía de Capa Fina de 3 pacientes



1.-Paciente Negativo

2.-Paciente Negativo

3.-Paciente Positivo

(-) Patrón Negativo

(+) Patrón Positivo

Todos los pacientes incluidos en este estudio, así como cuatro progenitores de enfermos, se estudiaron por la técnica CG/EM en la Universidad McMaster de Canadá donde se encontró un 100 % de coincidencia de los resultados obtenidos por CCF.¹¹

Conclusiones

Los resultados obtenidos avalan la utilidad de la cromatografía de capa fina para el diagnóstico del SLO. La sencillez de la técnica permite que sea empleada en laboratorios clínicos como una alternativa ante la

carencia de la cromatografía de gases/espectrometría de masa u otras tecnologías más modernas, o como un estudio de primera línea en la pesquisa de la enfermedad.

Referencias bibliográficas

- 1- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number:[270400]:[Date last edited 10/2/2012]: World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/270400>
- 2- Irons M, Elias ER, Salen G, Tint GS, Batta A. Defective cholesterol biosynthesis in Smith Lemli Opitz syndrome. *Lancet*. 1993;341:1414.
- 3- DeBarber AE, Eroglu Y, Merkens LS, Pappu AS, Steiner RD. Smith–Lemli–Opitz syndrome. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e24.
- 4- Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J Lipid Res*. 2011;52:6-34.
- 5- Porter FD. Smith Lemli Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet*. 2008;16:535-41.
- 6- European Organisation for Rare Diseases (EURORDIS). What is a rare disease? <http://www.eurordis.org>
- 7- Schieppati A, Henter JI, Daina E. Why rare diseases are an important medical and social issue. *Lancet*. 2008;371:2039 -41.
- 8- Dodge JA, Chigladze T, Donadieu J, Grossman Z, Ramos F, Serlicorni A, et al. The importance of rare diseases: from the gene to society. *Arch Dis Child*. 2011;96:791-792.
- 9- Batta AK, Tint GS, Shefer S, Abuelo D, Salen G. Identification of 8-dehydrocholesterol (cholesta-5, 8-dien-3 β -ol) in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res*. 1995;36:705-713.
- 10- Tint GS, Seller M, Hughes-Benzie R, Batta A, Shefer S, Genest D, Irons M, Elias E, Salen G. Markedly increased tissue concentrations of dehydrocholesterol combined with low level cholesterol are characteristic of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res*. 1995;36:89-94.
- 11- Nowaczyk M, Martin-Garcia D, Aquino-Perna A, Rodriguez-Vazquez M, McCaughey D, Eng B, et al. Founder effect for the T93M DHCR7 mutation in Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2004;125A(2):173-6.