

Título: Caracterización clínica y genética del síndrome de Smith-Lemli-Opitz en Cuba para la atención médica integral.

Autores: Dra. Diana Martín García

Lic. Angel Aquino Perna

Dr. Miguel Rodríguez Vázquez

Lic. Lídice Peraza Cruz

Centro Provincial de Genética Médica, Sancti Spíritus

diana.martin@ssp.sld.cu

telef. 0141-336306, 326936

Resumen:

El síndrome de Smith Lemli Opitz (SLO) es un error congénito del metabolismo del colesterol de herencia autosómica recesiva caracterizado por múltiples malformaciones congénitas, dismorfia facial y retraso mental. Los objetivos de este trabajo fueron: desarrollar técnicas de laboratorio para el diagnóstico bioquímico y molecular del síndrome de SLO, caracterizarlo clínica y genéticamente y establecer un protocolo para el diagnóstico y la atención de la enfermedad. Se realizaron ensayos con cromatografía de capa fina (CCF) para probar su sensibilidad y especificidad para el diagnóstico. Se establecieron criterios de sospecha de la enfermedad, se capacitaron a los especialistas para elevar el diagnóstico clínico y se realizó una pesquisa en instituciones de atención a discapacitados mentales. Se estableció una colaboración con la Universidad McMaster de Canadá que permitió realizar los primeros análisis moleculares y posteriormente se estandarizó el estudio de cuatro mutaciones. Se probó la utilidad de la CCF en el diagnóstico y se identificaron 21 pacientes. Entre las principales características clínicas se encontraron el retraso mental o psicomotor, la sindactilia 2-3 de los pies, la dismorfia facial, la microcefalia, el retardo pondoestatural y las anomalías genitales en los varones. Se identificaron mutaciones en el 77% de los alelos, T93M y IVS8-1G>C representan el 70% de los alelos. Se realizó el diagnóstico prenatal en tres parejas de riesgo. Los pacientes

reciben tratamiento por una nueva dieta en el Dietario Médico. Se desarrolló un algoritmo de trabajo con lo que se logró mejorar la atención integral a enfermos y familiares.

Title: Clinical and genetic characterization of Smith-Lemli-Opitz syndrome in Cuba for integral medical attendance.

Authors: Dr. Diana Martín García
Lic. Angel Aquino Perna
Dr. Miguel Rodríguez Vázquez
Lic. Lídice Peraza Cruz

Center of Medical Genetics, Sancti Spíritus, Cuba

Abstract:

The Smith-Lemli-Opitz (SLO) syndrome is an autosomal recessive inborn error of cholesterol metabolism characterized by many congenital anomalies, a distinctive facial appearance and mental retardation. The objectives of this work were: to develop laboratory diagnostic methods for biochemical and molecular confirmation, to characterize clinical and genetically the disease in Cuban patients and to establish a strategy for diagnosis and attendance of patients and families. Laboratory determination of 7-dehydrocholesterol, its sensitivity and specificity, was assayed using a thin layer chromatography method (TLC). The main clinical features were selected for suspicion of SLO, the doctors were training for clinical diagnosis and a screening was applied among mental retarded patients from institutions. The first ten patients were studied in collaboration with McMaster University, later the study of four mutations was standardized in our lab. The utility of TLC was probed and 21 patients were detected. Mental or psychomotor retardation, 2-3 toe syndactyly, facial dysmorphism, microcephaly, growth retardation and genital anomalies in males were the most common clinical characteristics. The pathogenic mutation was recognized in 77% of studied alleles, T93M and IVS8-1G>C represented 70% of the whole. Three risk pregnancies were prenatally studied. A diet for the treatment of patients was included in the National Medical Dietary. It was developed a practical algorithm to improve the care of patients and families.

Introducción

El síndrome de Smith Lemli Opitz (SLO) (Mc Kusick no. 270400) es una enfermedad genética, de herencia autosómica recesiva, caracterizada por un amplio espectro fenotípico que incluye retraso mental, microcefalia, retardo del desarrollo pondoestatural, rasgos dismórficos faciales, malformaciones congénitas y trastornos de conducta. La enfermedad fue descrita por primera vez en 1964 pero no es hasta 1993 que se identifica como un error congénito del metabolismo. Existe una deficiencia de la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa, que cataliza la última reacción en la síntesis del colesterol, por lo que la enfermedad se caracteriza por bajos niveles de colesterol e incrementados del precursor 7-dehidrocolesterol (7DHC) y su isómero el 8-dehidrocolesterol (8DHC). El marcador bioquímico de la enfermedad es el incremento del 7DHC, demostrado por cromatografía de gases/espectrometría de masa (CG/EM) u otras tecnologías modernas.

En 1998 fue clonado el gen DHCR7 e identificadas las primeras mutaciones patogénicas, que ya suman más de 130 con diferentes frecuencias según la región geográfica.

El empleo de los métodos bioquímicos y/o moleculares en el diagnóstico ha contribuido a una mejor caracterización clínica. Se ha observado que otras enfermedades genéticas pueden tener un solapamiento fenotípico con el SLO y conducir a errores en el diagnóstico clínico, de lo que se deriva la importancia de los estudios de laboratorio para el diagnóstico definitivo del SLO.

El tratamiento consiste en la administración de colesterol a través de la dieta o como preparado farmacéutico, con lo que se ha reportado mejoría de la calidad de vida de los enfermos.

Por el modo de herencia de esta enfermedad los padres de un niño enfermo tienen una probabilidad del 25% en cada embarazo de tener otro hijo afectado. Desde la década del 90 es posible un diagnóstico prenatal seguro con el empleo de las técnicas bioquímicas y moleculares, de manera independiente o complementándose.

Estudios poblacionales han estimado que la incidencia al nacimiento del SLO varía entre 1/15 000 y 1/70 000, por lo que el SLO se incluye entre las enfermedades huérfanas, raras o de baja prevalencia.

Los pacientes con estas enfermedades sufren una serie de dificultades directamente relacionadas con la rareza de su padecimiento. El conocimiento científico sobre la enfermedad es escaso o nulo y si existe no es del dominio de los profesionales de la salud y de la sociedad en general. Tienen dificultades para acceder a un diagnóstico correcto y al tratamiento en caso que exista. Por todas estas razones no reciben una atención médica de calidad y están en franca desventaja social.

La comunidad internacional ha trazado estrategias encaminadas a disminuir las diferencias entre quienes sufren enfermedades comunes y raras. Entre las acciones realizadas está la creación de grupos y centros expertos encargados de la investigación, el desarrollo de nuevos procedimientos diagnósticos y terapéuticos y la formación y actualización de los conocimientos de los restantes profesionales para mejorar el diagnóstico, el tratamiento y la prevención. Debido al gran número de enfermedades raras se hace muy difícil la creación de centros expertos en cada país por lo que existe una gran colaboración internacional. Lo anterior, sumado a la creación de registros y de asociaciones de pacientes y familiares, ha desempeñado un rol importante en la mejoría asistencial, de las investigaciones clínicas y epidemiológicas y en la difusión de conocimientos que ayudan a la integración familiar y social.

Justificación del estudio

Excepto la presentación de dos casos clínicos por la Dra. Borbolla en 1974, no existían evidencias del estudio del síndrome de Smith Lemli Opitz en el país ni estaba disponible en el sistema de salud cubano la tecnología internacionalmente empleada para el diagnóstico, lo que impedía a los pacientes y sus familiares beneficiarse de los avances en el conocimiento de la enfermedad que se estaban generando internacionalmente.

Problema de investigación

Inexistencia en el país de un protocolo para la atención al paciente con síndrome de Smith Lemli Opitz basado en el diagnóstico clínico y apoyado en la tecnología bioquímica y molecular.

Objetivos

- 1- Desarrollar técnicas de laboratorio para el diagnóstico bioquímico y molecular del síndrome de Smith Lemli Opitz.
- 2- Caracterizar clínica y genéticamente del síndrome de Smith Lemli Opitz en Cuba.
- 3- Establecer un protocolo para el diagnóstico y la atención de la enfermedad en el país.

Fundamento metodológico

El estudio se desarrolló entre enero de 2001 y diciembre de 2011 y constó de varias etapas.

Etapas 1: Desarrollo de una técnica de laboratorio para el diagnóstico bioquímico del síndrome de SLO

La secuencia de acciones seguida fue:

- a) Determinación de la sensibilidad de la Cromatografía de capa fina (CCF) en la detección de esteroides utilizando como patrón de prueba soluciones de colesterol en cloroformo a diferentes diluciones y plasma del único paciente cubano con SLO diagnosticado por CG/EM.
- b) Evaluación de la especificidad de la técnica en muestras de plasma de 40 casos controles no afectados.
- c) Realización de la técnica a pacientes con características clínicas sugestivas de la enfermedad y en familiares de primer grado.
- c) Validación de los resultados obtenidos con los alcanzados mediante la CG/EM en la Universidad McMaster, de Hamilton, Canadá.

Etapas 2: Diagnóstico, tratamiento y caracterización clínica de los pacientes

Identificación de pacientes con fenotipo sugestivo de SLO

- a) Selección de los pacientes con diagnóstico clínico de SLO existentes en los registros de los servicios de Genética Clínica de los Hospitales Pediátricos William Soler, Juan Manuel Márquez y Centro Habana y de los Centros Provinciales de Genética Médica.
- b) Pesquisa entre pacientes con retraso mental atendidos en 15 Centros Psicopedagógicos de seis provincias y una escuela especial para personas con discapacidad mental.
- c) Selección de pacientes con fenotipo sugestivo de SLO en los servicios de Genética Clínica de todas las provincias posterior a la capacitación de los especialistas y basada en metodología diagnóstica elaborada para la investigación.

Diagnóstico bioquímico

En los pacientes con fenotipo sugestivo de SLO se realizó estudio de esteroides por CCF, un primer grupo fue estudiado también por CG/EM en la Universidad McMaster.

Instauración de tratamiento

A todos los pacientes con diagnóstico bioquímico positivo se les indicó tratamiento con dieta rica en colesterol.

Caracterización clínica

Los pacientes con diagnóstico bioquímico positivo fueron examinados por la autora principal y la información registrada en una historia clínica confeccionada para su uso en la investigación. Se calculó el score de severidad anatómica según Kelley y Hennekam. La participación en la investigación fue voluntaria por lo que los padres o tutores firmaron el consentimiento informado.

Etapas 3: Caracterización molecular

Se realiza en una primera etapa por metodología de amplificación refractaria de simples mutaciones (ARMS-siglas del inglés) y secuenciación establecida en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad McMaster que permitió identificar mutaciones patogénicas y polimorfismos intragénicos en el gen DHCR7.

La segunda etapa se realiza en el Centro de Genética Médica de Sancti Spíritus. Se diseñaron los primers y se estandarizaron las técnicas para el estudio por ARMS de las mutaciones IVS8-1G>C, T93M, F302L y D234Y. También se empleó una técnica de reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción previamente descrita para IVS8-1G>C. Todos los reactivos necesarios fueron adquiridos por el MINSAP. La tecnología se utilizó además en el diagnóstico de portadores y en un caso de diagnóstico prenatal.

Resultados y discusión

Etapas 1: Descripción y resultados de la técnica que se propone como alternativa para el diagnóstico bioquímico del síndrome de SLO en Cuba

El método consiste en la extracción de los esteroides de una muestra de plasma sanguíneo de los pacientes y posterior análisis por CCF. La extracción de los esteroides se realiza según métodos tradicionales. Resumiendo el proceso: se extraen a partir de 500 μ L de plasma sanguíneo fresco o conservado en congelación (-20°C), para lo que se somete éste a un proceso de saponificación con Hidróxido de Sodio (BDH) etanólico 1N en baño de maría a 60°C por una hora. Luego se procede a la extracción como tal con 6 mL de Hexano (Merck), aunque puede ser usado también Éter de Petróleo y Pentano. Se centrifuga a 1000 rpm por 5 min. Posteriormente se lava con agua destilada, se centrifuga nuevamente, se colecta la fase orgánica y se deja evaporar el solvente hasta sequedad bajo campana, cuidando no exponer la muestra a la luz intensa.

Para la determinación cualitativa de los esteroides extraídos se procede a la CCF según métodos reportados con algunas modificaciones (8,58). Se preparan las placas de Sílicagel 60 (Merck) activándolas por 10 minutos a 110°C , luego se procede a la impregnación con 10% de Nitrato de Plata (Sigma) en solución metanol:agua (1:1), se deja secar al aire por 10 min y se incuba por una hora a 110°C . Se diluyen los esteroides extraídos en 100 μ L de cloroformo y se aplican 10 μ L por tres ocasiones sobre el mismo punto de origen. Entre una aplicación y otra se espera por la sequedad del solvente. Se montan siempre controles positivo y negativo para esta enfermedad.

Finalmente se dejan correr utilizando una mezcla solvente de cloroformo:acetona (85:15) a 4°C . El proceso se realiza en la oscuridad y el revelado se lleva a cabo mediante el tratamiento de las placas con spray de Ácido Sulfúrico al 20 %. Las placas se secan al horno por 20 minutos a 110°C . Se determina el R_f y se comprueba con el esperado en estas condiciones que para colesterol, 7DHC y 8DHC resultan ser 0.73, 0.32 y 0.57 respectivamente.

En ninguna de las 40 personas sanas estudiadas se detectó 7-DHC y 8-DHC, resultado esperado ya que estos esteroides son prácticamente indetectables aún por CG/EM en sujetos no afectados por esta enfermedad. La prueba de sensibilidad a la detección cualitativa de 7-DHC y 8-DHC demostró que esta técnica puede determinar claramente

hasta 20 µg de esterol/mL plasma, valor por encima del cual se encuentra más del 90% de los pacientes descritos en la literatura.

En los primeros 21 pacientes con características clínicas sugestivas de SLO, se detectó la presencia de 7-DHC y 8-DHC en 10 pacientes, estos 21 pacientes y cuatro progenitores fueron analizados posteriormente por CG/EM en la Universidad McMaster y hubo una total correlación entre los resultados obtenidos por ambas técnicas, lo que avala la especificidad y sensibilidad del método propuesto.

Etapas 2: Diagnóstico, tratamiento y caracterización clínica de los pacientes

Hasta diciembre del año 2000 en los servicios de Genética Clínica del país se registraron 16 pacientes con sospecha clínica de SLO. En las instituciones de atención a personas con discapacidad mental fueron evaluados 1226 pacientes y 16 cumplieron los criterios de *fenotipo sugestivo de SLO*. Durante el periodo de la investigación se sospechó la enfermedad en 50 pacientes atendidos en los servicios de Genética Clínica de 13 provincias y la Isla de la Juventud. En general el estudio bioquímico se realizó en 77 pacientes y en 21 se confirmó el diagnóstico (15 varones y 6 hembras).

Para garantizar el tratamiento de los pacientes con diagnóstico confirmado se estableció en el Dietario Médico Nacional la dieta 39-ES y se ha adquirido colesterol purificado.

En el periodo del estudio el número de casos sospechados clínicamente fue cuatro veces superior a los de los años anteriores al mismo, lo que indica que es una enfermedad mejor conocida por los médicos. No obstante, la relación varones/hembras de 2.5:1, evidencia un subdiagnóstico en las hembras, ya que al tratarse de una enfermedad autosómica recesiva se esperaría una relación entre ambos sexos de 1:1. Esta situación se explica por la alta frecuencia de anomalías genitales en los varones que facilita el diagnóstico.

La consanguinidad parental existe solamente en un enfermo y en una familia se refiere una tía del propósito ya fallecida con características similares. Ambos hallazgos hacen

pensar que el SLO en Cuba no es una enfermedad extremadamente rara, lo cual se ha sugerido también en otras poblaciones.

En el periodo neonatal los hallazgos más frecuentes encontrados fueron la hipotonía (95%) y las dificultades en la alimentación (67%), ambas referidas en la literatura como signos importantes para el diagnóstico en edades tempranas.

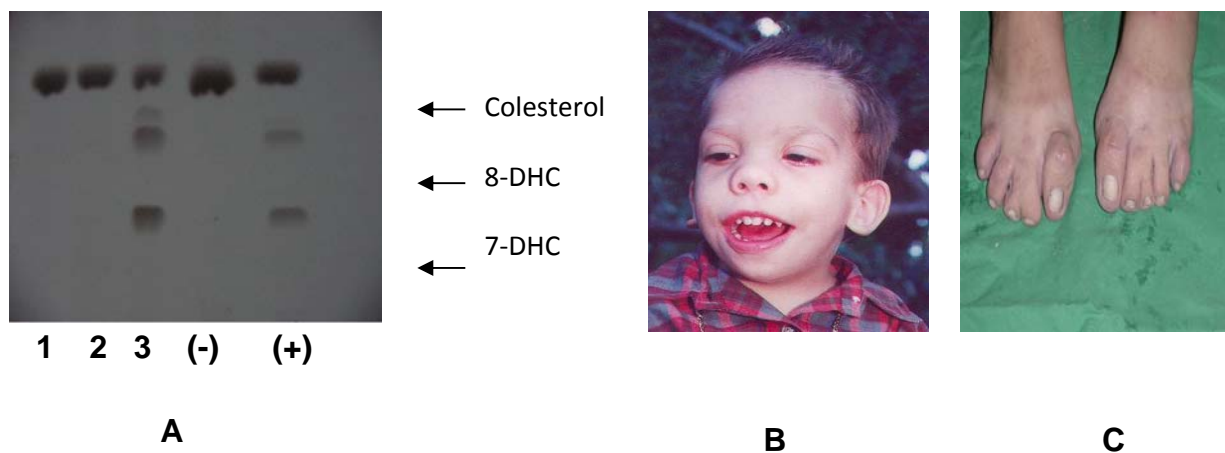
Se observó una declinación estadísticamente significativa del peso, la talla y la circunferencia cefálica al nacimiento y al momento en que se realizó el diagnóstico bioquímico (que osciló entre el mes de vida y los 34 años) similar a lo reportado por otros autores.

Además de la microcefalia las características craneofaciales más frecuentes son: estrechamiento bitemporal, micrognatia, ptosis palbebral, estrabismo, nariz de puente deprimido, punta ancha y narinas en anteversión, las orejas grandes, poco enrolladas, de implantación baja y/o rotación posterior. El conjunto de estos rasgos dismórficos dan a la cara un aspecto característico que facilitan el diagnóstico de la enfermedad pero que en ocasiones son muy sutiles.

Se encontraron múltiples anomalías en el sistema osteomioarticular. El signo encontrado en la totalidad de los pacientes es la sindactilia membranosa entre los dedos 2 y 3 de los pies, referida en la literatura el alrededor del 95% de los casos. Aunque en este grupo de pacientes más del 50% tienen sindactilia 2-3 parcial en forma de Y que es la variedad más comúnmente reportada, varía desde sindactilia mínima hasta total, de la misma forma en que se presenta la sindactilia 2-3 autosómica dominante (McKusick 185900) que por su frecuencia es considerada una variante normal. Según la experiencia de los autores de este trabajo, la sindactilia 2-3 es subvalorada por los genetistas clínicos, cuando en realidad debe hacer pensar en el SLO como las manchas café con leche en la Neurofibromatosis. Esta idea se ha llevado a los especialistas en las diferentes tareas de capacitación de esta investigación y varios pacientes (algunos con evaluaciones previas) han sido diagnosticados a partir de la valoración de este signo clínico.

Las anomalías genitales están presentes en el 87% de los varones y varía desde hipospadia hasta genitales ambiguos, resultados que se corresponden con los de otros autores.

Existe coincidencia con otros estudios en cuanto al tipo de malformaciones más comunes



en los aparatos cardiovascular, digestivo y génito-urinario. La baja cobertura de exámenes imagenológicos del sistema nervioso central puede explicar la baja frecuencia de defectos detectados (11%).

De acuerdo al score de severidad anatómica de Kelley y Hennekam todos los pacientes tienen fenotipo ligero o moderado.

El retardo del desarrollo psicomotor o retraso mental (moderado o severo) y las dificultades del desarrollo del lenguaje activo (en pacientes de dos años o más) ocurre en el 100% de los casos. Ambos hallazgos se incluyen entre las características más frecuentes de la enfermedad.

Los trastornos conductuales en el SLO son muy comunes, diversos y de severidad variable, de la misma manera que se observa en el 90% de los casos de esta investigación. Se plantea que en más del 50% de los pacientes las manifestaciones conductuales se incluyen dentro del espectro autista, por lo que se considera al SLO como la enfermedad genética más relacionada con el autismo, lo que sugiere una posible relación del metabolismo del colesterol con la fisiopatología del autismo.

Figura 1. **A-** Cromatografía de capa fina, 1 y 2 corresponden a personas sanas, 3 enfermo, (-) control negativo y (+) control positivo. **B-** Facies característica del SLO (fotografía presentada con autorización de los padres). **C-** Sindactilia 2-3 en forma de Y.

Etapas 3: Identificación de mutaciones en el gen DHCR7 en pacientes con diagnóstico bioquímico positivo

Mutaciones patogénicas

Se detectaron mutaciones en los 20 alelos estudiados en la Universidad McMaster y en 11 de los 20 analizados en el laboratorio cubano, la diferencia en el rango de identificación de mutaciones entre ambos laboratorios obedece a la carencia de la tecnología de secuenciación en el segundo de ellos. De manera global se detectaron mutaciones en el 77.5% de los alelos. En orden de frecuencia las mutaciones detectadas fueron T93M (17 alelos - 42.5%), IVS8-1G>C (11alelos - 27.5%), F302L, V281M y D234Y son portadas cada una en un alelo (2.5%).

La mutación T93M se encuentra en alrededor del 10% de los pacientes de todo el mundo, los resultados encontrados en este estudio ubican a Cuba como el país con más alta frecuencia de esta mutación hasta ahora conocida. IVS8-1G>C es la más frecuente internacionalmente aunque con grandes variaciones entre las poblaciones. F302L representa alrededor del 15% de las mutaciones en España pero es muy rara en otras poblaciones. La mutación V281M es rara y D234Y no había sido reportada con anterioridad.

Relación entre las frecuencias alélicas y los genotipos

Si se considera que la población cubana está en equilibrio de Hardy Weinberg no existe correspondencia entre los genotipos esperados y observados: los homocigotos para T93M y IVS8-1G>C están subrepresentados mientras que los heterocigotos exceden la cantidad esperada. Un análisis conjunto con pacientes italianos, portugueses y brasileños en los que las mutaciones T93M y IVS8-1G>C son las más frecuentes (se exceptuaron los españoles porque no están publicados los genotipos) generaron resultados similares.

Todos los homocigotos para IVS8-1G>C publicados han sido fetos polimalformados o recién nacidos o niños pequeños con un fenotipo severo que han muerto tempranamente, como ocurre con el único caso de esta serie conjunta de pacientes analizada, lo que puede explicar la escasa representación de este genotipo.

Una explicación a la menor frecuencia de homocigotos para T93M es que este genotipo puede originar fenotipos muy leves, no solo desde el punto de vista anatómico, sino dismórfico y conductual, lo que dificulta su diagnóstico, como en uno de los pacientes cubanos.

La sobreexpresión de los heterocigotos compuestos IVS8-1G>C/T93M sugiere que la verdadera frecuencia de ambas mutaciones es superior de lo que puede estimarse a partir de las frecuencias de los genotipos identificados y por tanto la frecuencia de la enfermedad es también mayor.

Haplotipos asociados a las mutaciones patogénicas

En los diez pacientes en los que se hizo el estudio de haplotipos se encontró que la mutación T93M está ligada al haplotipo J. En otros estudios la asociación entre T93M y el haplotipo J solo se ha encontrado en pacientes originarios o con ancestros de España, Portugal, Italia, Grecia, Turkía y también de los Estados Unidos, a pesar que ese haplotipo es raro (5-8%) en los alelos normales de esas mismas poblaciones. En pacientes de origen noreuropeo la mutación T93M se asocia a los haplotipos A, B, E y K. La identificación de una alta frecuencia de la mutación T93M en pacientes cubanos y su asociación al haplotipo J al igual que en otros pacientes originarios de países del norte del Mediterráneo sugieren un efecto de fundador de la mutación T93M en esa región geográfica.

Diagnóstico prenatal y de portadores

Se realizaron tres estudios prenatales en parejas con un hijo previo afectado. El último de ellos se llevó a cabo en el Centro de Genética Médica de Sancti Spíritus. El genotipo de la hermana del feto era IVS8-1G>C/T93M, se procedió a realizar amniocentesis a las 18 semanas de gestación y se estudiaron ambas mutaciones en ADN de líquido amniótico empleando las técnicas previamente estandarizadas en la institución. Se diagnosticó un feto sano portador de la mutación T93M.

La posibilidad de diagnóstico prenatal bioquímico y/o molecular en el SLO es de gran importancia en el asesoramiento genético debido a que el ultrasonido, que es el método más difundido para el diagnóstico prenatal, puede detectar defectos estructurales en

fetos enfermos, pero la escasa especificidad, la ausencia o la aparición tardía de tales anomalías hacen que éste no sea un método de elección para el diagnóstico prenatal.

Se identificaron cuatro personas portadoras entre seis familiares de primero, segundo o tercer grado del propósito de dos familias y la nueva pareja de la madre de un enfermo.

En las enfermedades autosómicas recesivas de baja prevalencia, generalmente no se realiza estudios de portadores porque la frecuencia de éstos en la población es baja y por tanto la probabilidad de que en una pareja ambos miembros sean portadores es más baja aún. Sin embargo, varios estudios en poblaciones de origen caucásico, han estimado una frecuencia de portadores de SLO 3 a 4%. A lo anterior se suma que el compromiso en el desarrollo embriológico, el intelecto, la conducta y la salud en general genera en los familiares del enfermo un gran temor a la enfermedad.

Correlación genotipo- fenotipo

De los 20 pacientes en los que se realizó el estudio molecular, ocho tienen el genotipo T93M/IVS8-1G>C, dos son T93M/T93M, uno T93M/F302L, uno T93M/V281M y uno T93M/D234Y. En los demás pacientes no se conoce con exactitud el genotipo porque no está identificada la segunda mutación. Tal como se observa aquí, internacionalmente se reporta un predominio de heterocigotos compuestos debido a la gran heterogeneidad alélica, lo que hace difícil evaluar la correlación genotipo-fenotipo.

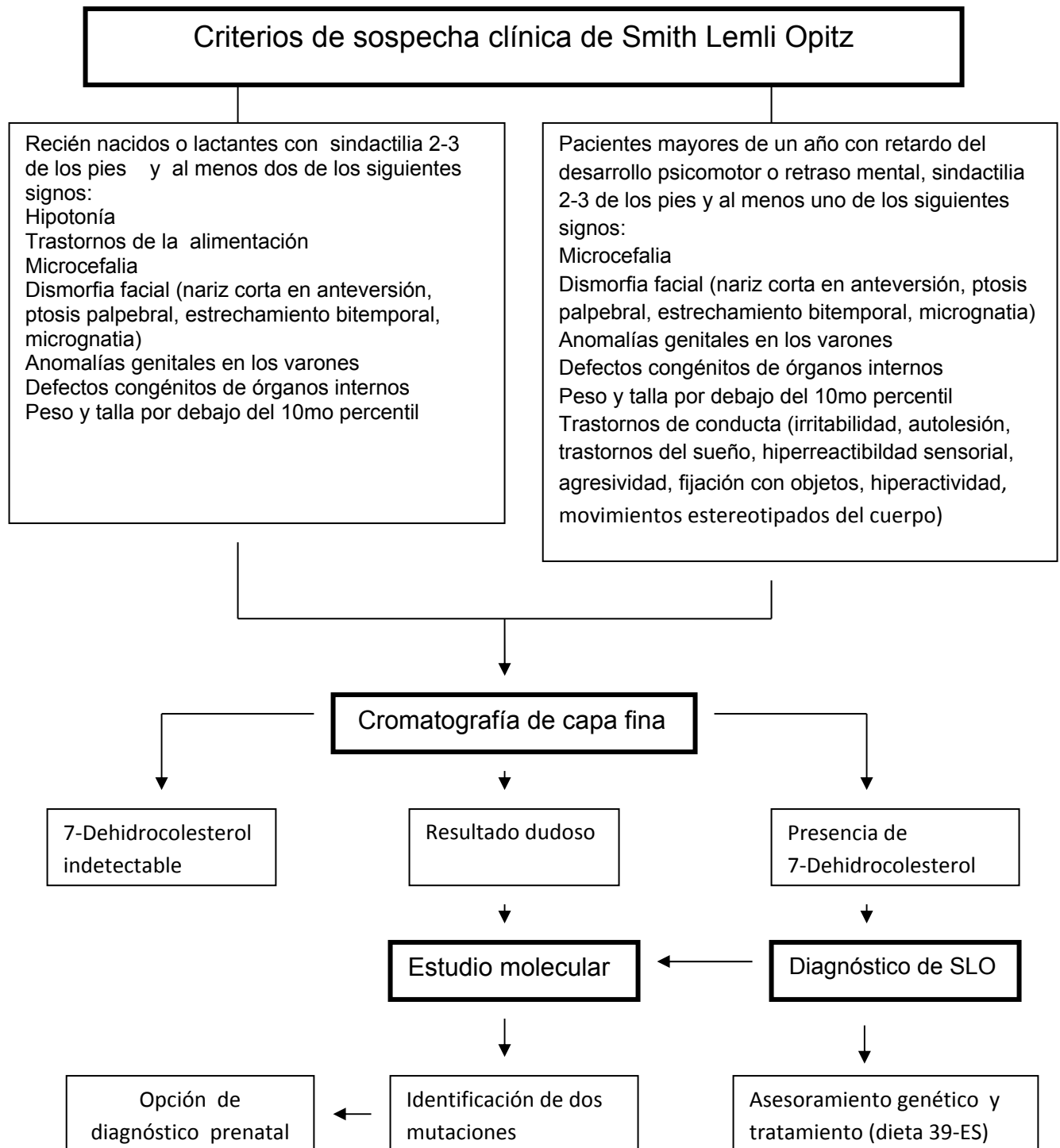
Incluyendo los pacientes de esta serie y los reportados en la literatura, son treinta los heterocigotos compuestos para T93M/IVS8-1G>C, el 90% de los cuales tienen fenotipos ligeros o moderados. En pacientes con este genotipo la severidad está muy relacionada con la actividad residual de la enzima 7DHC reductasa ocasionada por la mutación T93M, ya que IVS8-1G>C causa abolición de dicha actividad.

Los dos pacientes de esta investigación que son homocigotos para T93M tienen fenotipo ligero según el score de severidad anatómica de Kelley y Hennekam, sin embargo uno de ellos tiene un fenotipo clásico mientras el otro tiene mínima dismorfia facial, circunferencia cefálica y desarrollo pondoestatural normales y escasos trastornos conductuales. Tres pacientes con igual genotipo han sido publicados. En dos se conoce el score de severidad, que es ligero.

No se encontró referencias en la literatura de pacientes con los genotipos T93M/V281M, T93M/F302L y T93M/D234Y, pero el fenotipo ligero de esos tres pacientes se corresponde con lo referido para heterocigotos compuestos de mutaciones transmembranales.

Una paciente tiene un fenotipo ligero de SLO con una microforma de HPE y es heterocigota compuesta para dos mutaciones transmembranales. Existen varios casos publicados con SLO y formas clásicas de HPE que son homocigotos o heterocigotos compuestos para mutaciones nulas que abolen la actividad enzimática. La ocurrencia de HPE en el SLO se relaciona con la participación del colesterol en el autoprocesamiento de la proteína Shh y en otros eventos de la cascada de señalización embriológica. Sin embargo, en este caso la deficiencia de la síntesis del colesterol por si sola no explica la aparición de la HPE, quizás existan mutaciones concomitantes en otros genes relacionados con la HPE.

Propuesta de algoritmo para la atención integral del SLO en CUBA



Conclusiones

1- La aplicación de la cromatografía de capa fina en la identificación de esteroides plasmáticos, a pesar de no estar reportada como método diagnóstico, demostró ser una alternativa para la detección de la enfermedad sin dependencia de la alta tecnología internacionalmente empleada.

2- Se desarrollaron métodos bioquímicos y moleculares para el diagnóstico del síndrome de Smith Lemli Opitz que han permitido elevar la calidad del asesoramiento genético en Cuba, fundamentado en el establecimiento de acciones asistenciales derivadas del estudio como el tratamiento dietético y el diagnóstico prenatal.

3- La identificación de la enfermedad en pacientes con fenotipos más ligeros pudiera estar favorecida al utilizar como criterio de sospecha diagnóstica la sindactilia 2-3 de los pies presente en la totalidad de los casos confirmados.

4- La alta frecuencia de la mutación T93M asociado al haplotipo J en Cuba probablemente resulte de un efecto fundador.

5- La baja frecuencia de consanguinidad, el menor número de hembras afectadas y la disminución de los homocigotos esperados para mutaciones causantes de fenotipos extremos demuestran que existe un subdiagnóstico de la enfermedad.

6- El número de pacientes diagnosticados durante la investigación basado en las metodologías diagnósticas clínico, bioquímico y molecular, las nuevas opciones de asesoramiento genético fundamentado en la identificación de portadores, el diagnóstico prenatal y el tratamiento dietético validan el algoritmo propuesto para la atención integral de los enfermos y sus familiares en Cuba.

Bibliografía

DeBarber AE, Eroglu Y, Merkens LS, Pappu AS, Steiner RD. Smith–Lemli–Opitz syndrome. *Expert Rev Mol Med*. 2011;13:e24.

Porter FD. Smith Lemli Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet*. 2008;16:535-41.

Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J Lipid Res*. 2011; 52:6-34.

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.

Witsch-Baumgartner M, Fitzky BU, Ogorelkova M, Kraft HG, Moebius FF, Glossmann H, et al. Mutational spectrum in the (7-sterol reductase gene and genotype-phenotype correlation in 84 patients with Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2000;66:402-412.

Witsch-Baumgartner M, Clayton P, Clusellas N, Haas D, Kelley RI, Krajewska-Walasek M, et al. Identification of 14 novel mutation in DHCR7 causing SLOS and delineation of the mutational spectra in Spain and Italy. *Hum Mut*. 2005;25(4):412.

Bukelis I, Porter FD, Zimmerman AW, Tierney E. Smith Lemli Opitz syndrome and autism spectrum disorder. *Am J Psychiatry*. 2007;164(11):1655-61.

Martín-García D, Aquino-Pernas A, Rodríguez-Vázquez M. Síndrome de Smith Lemli Opitz. Reporte de caso. *Rev Cub Genét Hum*. 2001; 3(1).

Nowaczyk M, Martin D, Eng B, Waye J: Rápido molecular prenatal diagnosis of Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2001;102:387-88.

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.

