

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE VILLA CLARA
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE SANCTI SPÍRITUS
CENTRO DE GENÉTICA MÉDICA DE SANCTI SPÍRITUS**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA
DEL SÍNDROME DE
SMITH LEMLI OPITZ EN CUBA**

Trabajo en opción del título de Dr. en Ciencias Médicas

Autora: Dra. Diana Martín García

SANCTI SPÍRITUS

2015

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE VILLA CLARA
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE SANCTI SPÍRITUS
CENTRO DE GENÉTICA MÉDICA DE SANCTI SPÍRITUS**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA
DEL SÍNDROME DE
SMITH LEMLI OPITZ EN CUBA**

Trabajo en opción del título de Dr. en Ciencias Médicas

Autora: Dra. Diana Martín García

Tutora: Prof. Tit. Paulina Araceli Lantigua Cruz, DraC.

SANCTI SPÍRITUS

2015

No tiene límites el alma y en su deseo glorioso y férvido aspira siempre y llega siempre a la realización de los más arraigados ideales. Porque se llega a todo lo noble, todas las montañas se transforman con la firmeza de la voluntad.

José Martí

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A la tutora, DraC. Paulina Araceli Lantigua Cruz, profesora de profesores, por su ejemplo y sus orientaciones para la realización de este trabajo.

Al Lic. Angel Aquino Perna, amigo y compañero inseparable en este proyecto desde sus inicios, cuya labor ha sido definitoria para su éxito.

A la Dra. Malgorzata Nowaczyk y su equipo de trabajo de la Universidad McMaster de Canadá, por ofrecernos la oportunidad de realizar los primeros estudios bioquímicos y moleculares a pacientes cubanos.

A la DraC. Manuela Herrera Martínez, cuya evaluación y sugerencias han sido muy valiosas para el mejoramiento del documento escrito.

A los DresC. María Boffil Cárdenas, Emilio Carpio Muñoz, Roberto Lardoeyt Ferrer y Elena Hernández Navarro por sus señalamientos críticos.

Al Dr. Miguel Rodríguez Vázquez, director del Centro Provincial de Genética Médica de Sancti Spiritus, que estimuló mi desarrollo profesional desde mis inicios en la institución.

A mis estimados compañeros de trabajo por el apoyo que me han brindado y en especial a Islay, Yoanky y Carmen Aimeé por haber asumido en oportunidades mis funciones para facilitarme la redacción de este informe.

Al DrC. Vicente Fardales Macías y la Dra. Iralys Benítez por su ayuda en el análisis estadístico de los datos.

A los profesionales de la Red Nacional de Genética Médica sin los cuales no hubiera sido posible este trabajo.

A todas aquellas queridas personas que a lo largo de estos años me han ofrecido su ayuda desinteresada y su apoyo espiritual, especialmente a Cuqui, Anel, Marianela, Alián, Yamila, Madrigal, Mery, Reinaldo, Amiris, Valero, Ríos, Elizabeth y Miguel.

A mi familia extendida, por su amor y apoyo incondicional.

DEDICATORIA

DEDICATORIA

A mi adorada madre, faro de la familia, ejemplo de incondicionalidad y capacidad de sacrificio, mujer de extraordinaria sensibilidad humana

A mis hijos, que son mi más preciado tesoro

A mis abuelos, que ya no están físicamente, pero que aún siento su amor a mi lado

A Sonia y Yoel, mis hermanos, con los que siempre he podido contar

A mis queridos pacientes con Smith Lemli Opitz y sus familiares, especialmente a Iliana y Gustavo que fueron inspiradores de este trabajo

A todos los maestros y profesores que contribuyeron en mi formación

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABREVIATURAS UTILIZADAS

0: mutación nula

7DHC: 7-dehidrocolesterol

7DHCR: enzima 7-dehidrocolesterol reductasa

8DHC: 8-dehidrocolesterol

aa: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARMS: sistema de amplificación refractaria de mutaciones, del inglés amplification refractory mutation system

CAV: canal aurículo-ventricular

CC: circunferencia cefálica

CCF: cromatografía de capa fina

CDO: centro de diagnóstico y orientación

CG/EM: cromatografía de gases/espectrometría de masa

CIA: comunicación interauricular

CIUR: crecimiento intrauterino retardado

CIV: comunicación interventricular

CHCl₃: cloroformo

CoA: coartación de la aorta

CPGM-SS: Centro Provincial de Genética Médica de Sancti Spiritus

CpG: secuencia de ADN con un alto porcentaje de citosina y guanina

CSP: centro psicopedagógico

DHCR7: gen que codifica para la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa (7DHCR)

dNTPs: trifosfato de deoxinucleósido, del inglés deoxynucleoside triphosphate

EC: código de enzima, del inglés enzyme commission

EG: edad gestacional

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HMG-CoA reductasa: enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa

HPE: holoprosencefalia

K₃EDTA: anticoagulante ácido etilendiamino tetracético tripotásico, del inglés ethylenediamine tetraacetic acid

kDa: KiloDalton

kb: kilobase

kg: kilogramos

M: molar

MgCl₂: cloruro de magnesio

mL: mililitro

mM: milimolar

min: minutos

Na₂EDTA: ácido etilendiamino tetracético disódico, del inglés ethylenediamine tetraacetic acid

NaCl: cloruro de sodio

NaClO₄: perclorato de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

n.º: número

pb: pares de bases

PCA: persistencia del conducto arterioso

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés polymerase chain reaction

Ptch: proteína transmembranal que interviene en el proceso de señalización embriológica de Sonic Hedgehog, del inglés Patched

Rf: posición de un compuesto sobre una placa, del inglés ratio of front

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, del inglés restriction fragment length polymorphism

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato de sodio, del inglés sodium dodecyl sulfate

Shh: proteína que interviene en el proceso de señalización embriológica, del inglés Sonic Hedgehog

SHH: gen codificante de la proteína Sonic Hedgehog

SLO: Smith Lemli Opitz

Smo: proteína transmembranal que interviene en el proceso de señalización embriológica de Sonic Hedgehog, del inglés Smoothened

SNC: sistema nervioso central

SNPs: polimorfismos de un único nucleótido, del inglés single nucleotide polymorfisms

SOMA: sistema osteomioarticular

TAC: tomografía axial computarizada

Taq pol: ADN polimerasa obtenida de la bacteria *Thermus acuaticus*

TM: mutación transmembranal

tris: hidroximetil-aminometano

U: unidad

US: ultrasonido

vol: volumen

μL: microlitro

μmol/L: micromoles por litro

SÍNTESIS

SÍNTESIS

Se realizó un estudio entre los años 2001 y 2011 para caracterizar fenotípica y genéticamente a los pacientes cubanos con síndrome de Smith Lemli Opitz (SLO) y evaluar la correlación entre los fenotipos clínico y bioquímico y el genotipo DHCR7; para ello se realizó una pesquisa de pacientes con fenotipo sugestivo de SLO que permitió el análisis bioquímico de 77 probables enfermos y la confirmación diagnóstica de 21, a los que se les realizó la caracterización clínica y familiar. El estudio del gen DHCR7 para identificar mutaciones patogénicas y SNPs se realizó en 20 enfermos. Las características clínicas encontradas son similares a las reportadas en otras series de casos pero todos los pacientes tienen un fenotipo clínico ligero o moderado; el 4,7 % de ellos descienden de matrimonios consanguíneos y el 95 % de los progenitores son de piel blanca. El número de hermanos afectados es inferior a lo esperado según el riesgo de recurrencia. La frecuencia fenotípica es 1/358 827 nacidos vivos, con un predominio de casos en el Centro del país y una relación masculino/femenino de 2,4/1. La tasa de prevalencia en el año 2011 fue de 0,16 por cada 100 000 habitantes. Las mutaciones identificadas fueron T93M, IVS8-1G>C, F302L, V281M y D234Y, la primera de ellas tiene una frecuencia de 0,425 (la más alta mundialmente) y la última no se conocía. En nueve alelos estudiados no se encontraron las mutaciones patogénicas por limitaciones tecnológicas. El ligamiento de T93M al haplotipo J sugiere efecto de fundador de esta mutación en Cuba. A pesar del pequeño tamaño de la muestra, los resultados indican que los genotipos formados por mutaciones transmembranales y nulas (T93M/IVS8-1G>C) se asocian a mayores alteraciones del metabolismo del colesterol y severidad clínica, que los genotipos formados por mutaciones transmembranales (T93M/T93M, T93M/F302L, T93M/V281M y T93M/D234Y).

ÍNDICE

ÍNDICE

Contenido	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	8
1.1. Antecedentes históricos	8
1.2. Principales características clínicas	9
1.3. Defecto bioquímico y genética molecular	10
1.4. Diagnóstico	12
1.5. Epidemiología	13
1.6. Fisiopatología	14
1.6.1. Participación del colesterol en la embriogénesis	14
1.6.2. Otras funciones del colesterol y su posible relación con las manifestaciones clínicas	18
1.7. Tratamiento	20

CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS FENOTIPOS BIOQUÍMICO Y CLÍNICO DE PACIENTES CON EL SÍNDROME DE SMITH LEMLI OPITZ	22
2.1. Introducción	22
2.2. Objetivos	22
2.3. Materiales y métodos	22
2.3.1. Establecimiento de los criterios para la selección de pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO	23
2.3.2. Capacitación a los profesionales involucrados	23
2.3.3. Vías y procedimientos para la selección de pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO	23
2.3.3.1. Pacientes con diagnóstico clínico de SLO antes del inicio de la investigación	23
2.3.3.2. Pesquisa en instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual	24
2.3.3.3. Pacientes atendidos en los servicios de Genética Clínica del país luego del inicio de la investigación	24
2.3.3.4. Criterios de exclusión.....	26
2.3.4. Reconocimiento del fenotipo bioquímico del SLO en pacientes con fenotipo	26

clínico sugestivo de la enfermedad	
2.3.4.1. Muestra	26
2.3.4.2. Procedimiento para la obtención, procesamiento y conservación de muestras de sangre	26
2.3.4.3. Procedimiento para el análisis de esteroides	27
2.3.4.3.1. Etapa I	27
2.3.4.3.1.1. Análisis de esteroides por CCF	27
2.3.4.3.1.2. Análisis de esteroides por CG/EM	28
2.3.4.3.2. Etapa II	28
2.3.5. Caracterización del fenotipo clínico en pacientes con SLO	28
2.3.5.1. Muestra	28
2.3.5.2. Procedimiento	28
2.3.6. Definición de variables.....	29
2.3.7. Recogida de los datos	31
2.3.8. Análisis y procesamiento de los datos	31
2.4. Resultados	32
2.4.1. Selección de pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO	32

2.4.2. Reconocimiento del fenotipo bioquímico del SLO en pacientes con fenotipo clínico sugestivo de la enfermedad	33
2.4.3. Caracterización del fenotipo clínico de pacientes con SLO	34
2.4.3.1. Características generales	34
2.4.3.2. Historia del embarazo, nacimiento y periodo neonatal	34
2.4.3.3. Desarrollo físico	34
2.4.3.4. Características craneofaciales	35
2.4.3.5. Sistema osteomioarticular (SOMA)	35
2.4.3.6. Genitales	36
2.4.3.7. Órganos internos	36
2.4.3.8. Desarrollo psicomotor y fenotipo conductual	37
2.4.3.9 Otras características clínicas	38
2.4.3.10. Severidad clínica de la enfermedad	38
2.5. Discusión	39
2.5.1. Selección de pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO	39
2.5.2. Reconocimiento del fenotipo bioquímico del SLO en pacientes con fenotipo clínico sugestivo de la enfermedad	40

2.5.3. Caracterización del fenotipo clínico de pacientes con SLO	41
2.5.3.1. Características generales	41
2.5.3.2. Historia del embarazo, nacimiento y periodo neonatal	41
2.5.3.3. Desarrollo físico	42
2.5.3.4. Características craneofaciales	43
2.5.3.5. Sistema osteomioarticular (SOMA)	43
2.5.3.6. Genitales	44
2.5.3.7. Órganos internos	44
2.5.3.8. Desarrollo psicomotor y fenotipo conductual	45
2.5.3.9. Otras características clínicas	46
2.5.3.10. Severidad clínica de la enfermedad	46
2.6. Conclusiones del capítulo	47
CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL SÍNDROME DE SMITH LEMLI OPITZ EN CUBA	48
3.1. Introducción	48
3.2. Objetivos	48

3.3. Materiales y métodos	48
3.3.1. Evaluación del comportamiento genealógico.....	48
3.3.1.1. Muestra	48
3.3.1.2. Procedimiento	48
3.3.2. Evaluación del comportamiento poblacional	49
3.3.2.1. Muestra	49
3.3.2.2. Procedimiento	50
3.3.3. Análisis de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7	51
3.3.3.1. Procedimiento para la obtención, conservación y traslado de ADN.	51
3.3.3.2. Identificación de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7	52
3.3.3.2.1. Etapa I	52
3.3.3.2.1.1. Muestra	52
3.3.3.2.1.2. Procedimiento	52
3.3.3.2.2. Etapa II	53
3.3.3.2.2.1. Muestra	53
3.3.3.2.2.2. Procedimiento	53

3.3.3.3 Determinación de las frecuencias génicas y genotípicas en los pacientes estudiados molecularmente	55
3.3.3.3.1. Muestra	55
3.3.3.3.2. Procedimiento	55
3.3.4. Evaluación del posible efecto de fundador de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7.....	56
3.3.4.1. Muestra	56
3.3.4.2. Procedimiento	56
3.3.5. Definición de variables	56
3.3.6. Recogida de los datos	59
3.3.7. Análisis y procesamiento de los datos	59
3.3.8. Limitaciones del estudio	59
3.4. Resultados	60
3.4.1. Evaluación del comportamiento genealógico	60
3.4.1.1. Consanguinidad	60
3.4.1.2. Antecedentes familiares y evaluación de la concordancia entre la frecuencia observada y la esperada de hermanos afectados	60

3.4.1.3. Color de la piel	61
3.4.2. Evaluación del comportamiento poblacional	61
3.4.2.1. Frecuencia fenotípica de la enfermedad.....	61
3.4.2.2. Frecuencias genotípicas y génicas	62
3.4.3. Análisis de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7	62
3.4.3.1. Identificación de mutaciones patogénicas	62
3.4.3.2. Frecuencia de alelos mutados	62
3.4.3.3. Frecuencias genotípicas en los enfermos	63
3.4.4. Evaluación del posible efecto de fundador de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7.....	63
3.5. Discusión	64
3.5.1. Evaluación del comportamiento genealógico	64
3.5.1.1. Consanguinidad	64
3.5.1.2. Antecedentes familiares y evaluación de la concordancia entre la frecuencia observada y la esperada de hermanos afectados	65
3.5.1.3. Color de la piel	65
3.5.2. Evaluación del comportamiento poblacional	66

3.5.2.1. Frecuencia fenotípica de la enfermedad	66
3.5.2.2. Frecuencias genotípicas y génicas	67
3.5.3. Análisis de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7	67
3.5.3.1. Identificación de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7	67
3.5.3.2. Frecuencia de alelos mutados	68
3.5.3.3. Frecuencias genotípicas en los enfermos	70
3.5.4. Evaluación el posible efecto de fundador de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7	71
3.6. Conclusiones del capítulo	73
 CAPÍTULO 4. CORRELACIÓN ENTRE LOS FENOTIPOS BIOQUÍMICO Y CLÍNICO Y EL GENOTIPO DHCR7	 74
4.1. Introducción	74
4.2. Objetivos.....	74
4.3. Materiales y métodos	74
4.3.1. Obtención de los datos primarios	74
4.3.2. Correlación entre los fenotipos bioquímico y clínico	75
4.3.2.1. Muestra	75

4.3.2.2. Procedimiento	75
4.3.3. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7	75
4.3.3.1. Muestra	75
4.3.3.2. Procedimiento	75
4.3.4. Correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo DHCR7	75
4.3.4.1. Muestra	75
4.3.4.2. Procedimiento.	76
4.3.5. Definición de variables	76
4.3.6. Limitaciones del estudio	76
4.4. Resultados	77
4.4.1. Correlación entre los fenotipos bioquímico y clínico	77
4.4.2. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7	77
4.4.2.1. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7 según grupo genotípico	77
4.4.2.2. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7 idéntico	78
4.4.3. Correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo DHCR7	78

4.4.3.1. Correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo DHCR7 según grupo genotípico	78
4.4.3.1.1. Paciente con genotipo TM/TM y holoprosencefalia (HPE).....	79
4.4.3.2. Correlación del fenotipo clínico y el genotipo DHCR7 idéntico	79
4.5 Discusión	79
4.5.1. Correlación entre los fenotipos bioquímico y clínico	79
4.5.2. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7	81
4.5.2.1. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7 según grupo genotípico	81
4.5.2.2. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7 idéntico	82
4.5.3. Correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo DHCR7	82
4.5.3.1. Correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo DHCR7 según grupo genotípico	82
4.5.3.1.1. Paciente con genotipo TM/TM y holoprosencefalia (HPE)	83
4.5.3.2. Correlación del fenotipo clínico y el genotipo DHCR7 idéntico	85
4.5.4. Consideraciones acerca de la correlación entre el genotipo DHCR7 y los	86

fenotipos bioquímico y clínico	
4.6. Conclusiones del capítulo	90
CONCLUSIONES	91
RECOMENDACIONES	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
AUTOBIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Smith Lemli Opitz (SLO) (McKusick n.º 270400) ⁽¹⁾ 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 la conducta ⁽²⁻⁴⁾. Fue descrito por primera vez en 1964 ⁽⁵⁾ pero no es hasta 1993 que se identifica como un error congénito del metabolismo ⁽⁶⁾. Resulta de una deficiencia de la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa (7DHCR) que cataliza la última reacción en la síntesis del colesterol de Kandutsch-Russell, 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) ⁽⁶⁻⁸⁾. El marcador bioquímico de la enfermedad es el incremento del 7DHC, determinado generalmente por cromatografía de gases/espectrometría de masa (CG/EM) ^(2,9). El descubrimiento del defecto metabólico no solo permitió contar con evidencias bioquímicas que complementan el diagnóstico del síndrome y su asesoramiento genético, sino también dio inicio a una nueva era en las investigaciones básicas relacionadas con la participación del colesterol y su precursor en la embriogénesis y el funcionamiento del organismo en general.

En 1998 fue clonado el gen que codifica la enzima 7DHCR, que se conoce como DHCR7 ⁽¹⁰⁾; ese mismo año tres grupos independientes identifican las primeras mutaciones patogénicas ⁽¹¹⁻¹³⁾, que ya suman más de 150 con diferentes frecuencias según la región geográfica ⁽¹⁴⁾. La identificación de dos mutaciones en el gen DHCR7 también permite hacer el diagnóstico de SLO, lo que abrió nuevos horizontes en la prevención de esta enfermedad ^(2,3).

El empleo de los métodos bioquímicos y la caracterización de mutaciones en el gen DHCR7 han contribuido a la delineación del efecto pleiotrópico del gen y de las variaciones en la expresividad del

fenotipo y al mismo tiempo a excluir otras enfermedades genéticas u ocasionadas por teratógenos con manifestaciones clínicas similares ^(15,16).

Una vez definido el defecto bioquímico causante del síndrome se formuló la hipótesis que aportando una fuente exógena de colesterol se podía incrementar la concentración de este y disminuir la síntesis endógena de 7DHC, a través de la regulación de la vía metabólica por la HMG-CoA reductasa, por lo que el suplemento de colesterol a través de la dieta (fundamentalmente yema de huevo) y/o como preparado medicamentoso se convirtió en el tratamiento estándar ^(2,4,8,17). Varios estudios han mostrado una mejoría de los parámetros bioquímicos y de las manifestaciones clínicas después de iniciado el tratamiento ⁽¹⁷⁻²¹⁾; no se conocen efectos adversos de esta terapéutica en pacientes con SLO ⁽¹⁶⁾, pero sí pudiera tenerlos en personas que no sufren de este trastorno metabólico ⁽²²⁻²⁴⁾, un elemento más que apoya la importancia de los estudios de laboratorio para el diagnóstico definitivo del SLO.

Los padres de un niño enfermo tienen una probabilidad del 25 % en cada embarazo de tener otro hijo afectado debido al modo de herencia de esta enfermedad. Antes del descubrimiento de la etiología del SLO la única alternativa para el diagnóstico prenatal era la búsqueda de defectos fetales por ultrasonido (US), que no es un método específico ni altamente sensible ⁽²⁵⁾. Desde la segunda mitad de la década del 90 es posible un diagnóstico prenatal seguro con el empleo de las técnicas bioquímicas y moleculares, de manera independiente o complementándose ^(16,26,27).

Estudios en poblaciones de origen caucásico han estimado una frecuencia que varía entre 1/10 000 y 1/70 000 nacidos vivos ⁽⁴⁾, por lo que el SLO se incluye entre las enfermedades huérfanas, raras o de baja prevalencia.

Las enfermedades de baja prevalencia son aquellas que afectan a menos de cinco por cada 10 000 habitantes según criterios de la Unión Europea. Ellas no constituyen un problema de salud pública de manera independiente pero sí en su conjunto, al afectar a millones de personas y ocasionar una elevada mortalidad en edades tempranas de la vida ⁽²⁸⁻³⁵⁾.

Los pacientes con estas enfermedades sufren una serie de dificultades directamente relacionadas con la rareza de su padecimiento; el conocimiento científico sobre ellas suele ser escaso o a veces nulo, y cuando existe no es del dominio de un amplio número de profesionales de la salud y de la sociedad en general, además tienen dificultades para acceder a un diagnóstico correcto y al tratamiento en caso de que exista; por todas estas razones es frecuente que no reciban una atención médica de calidad ^(30,31,34).

La comunidad internacional ha trazado estrategias encaminadas a disminuir las diferencias entre quienes sufren enfermedades comunes y de baja prevalencia; 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 conocimientos de los restantes profesionales para mejorar el diagnóstico, el tratamiento y la prevención. Debido al amplio número de enfermedades de este tipo se hace muy difícil la creación de centros expertos en cada país por lo que existe una gran colaboración internacional ^(28,29,32-43).

A pesar de los avances en el conocimiento del SLO en el mundo, de los beneficios que estos representan para los pacientes y sus familiares y de las políticas dirigidas al estudio de las enfermedades de baja prevalencia, antes del inicio de esta investigación la única evidencia en Cuba de estudios sobre la misma era la presentación clínica de dos casos realizada por la Dra. Liane Borbolla en 1974 ⁽⁴⁴⁾. En el país no estaba caracterizado el fenotipo de los pacientes con SLO y el diagnóstico no era certero porque se basaba en características dismórficas y del neurodesarrollo típicas descritas en la literatura, provenientes de estudios en pacientes de diferente origen étnico, a lo que se le suma la expresividad variable del fenotipo y la existencia de manifestaciones clínicas comunes a otras enfermedades genéticas o debido a la influencia de factores ambientales durante la gestación. Todo esto representaba una limitante para el conocimiento básico de la enfermedad y el asesoramiento genético a las familias, por lo que era necesario el empleo de marcadores bioquímicos que permitieran la confirmación diagnóstica.

Por otra parte, no se conocían las características genéticas en pacientes cubanos, las mutaciones más frecuentes en el gen DHCR7, su posible origen y el efecto específico de cada una de ellas sobre la expresión de la proteína alterada y a su vez sobre el fenotipo clínico.

Lo anterior sirvió de **justificación** para la formación en el Centro Provincial de Genética Médica de Sancti Spiritus (CPGM-SS) de un grupo de especialistas dedicados a la investigación del síndrome de Smith Lemli Opitz en el país.

Problema de investigación:

No se conocen las características fenotípicas y genéticas del síndrome de Smith Lemli Opitz en Cuba.

Pregunta científica:

¿Cuáles son las características fenotípicas y genéticas de los pacientes cubanos con Smith Lemli Opitz?

Objetivo general:

Caracterizar fenotípica y genéticamente el síndrome de Smith Lemli Opitz en pacientes cubanos.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar el fenotipo bioquímico y clínico de los pacientes cubanos con Smith Lemli Opitz.
2. Caracterizar genéticamente el síndrome de Smith Lemli Opitz en Cuba.
3. Correlacionar los fenotipos bioquímico y clínico y el genotipo DHCR7.

Fundamento metodológico general de la tesis:

Se realizó un estudio descriptivo transversal en el periodo comprendido entre enero del 2001 y diciembre del 2011. A partir de la revisión de la literatura se establecieron los criterios de diagnóstico clínico a utilizar en la investigación y se capacitaron a genetistas clínicos, asesores genéticos y otros especialistas con el propósito de mejorar el diagnóstico de la enfermedad en el país. La selección de los pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO se realizó por tres vías: la búsqueda de los pacientes registrados con esa impresión diagnóstica en los servicios de Genética Clínica del país antes del inicio de la investigación, la pesquisa en instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual y la evaluación de pacientes en los servicios de Genética Clínica durante la investigación. A todos los enfermos con fenotipo clínico sugestivo de SLO se les realizó estudio de esteroides por cromatografía de capa fina (CCF) y/o CG/EM; en los que se demostró el fenotipo bioquímico de SLO fueron considerados pacientes con SLO y se les realizó una caracterización clínica y familiar exhaustiva para la que se aplicó la metodología propia de la Genética Clínica. Con posterioridad se hizo el estudio del gen DHCR7 por métodos de secuenciación, PCR-ARMS

y/o PCR-RFLP, que permitió la identificación de mutaciones patogénicas y los haplotipos SNPs ligados a dichas mutaciones con el objetivo de evaluar el posible efecto de fundador en Cuba de alguna de ellas. Para los estudios bioquímicos y moleculares se contó en una primera etapa con la colaboración de la Universidad McMaster de Canadá. A partir de la caracterización del fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7 se evaluó el comportamiento poblacional de la enfermedad. Para la correlación entre los fenotipos clínico y bioquímico y el genotipo DHCR7 se estimó la severidad del fenotipo clínico según el puntaje de Kelley y Hennekam ⁽¹⁵⁾, se consideraron los valores de colesterol y 7DHC determinados por CG/EM y se clasificaron las mutaciones en: sin sentido o nulas (0) y con sentido causantes de sustituciones aminoacídicas en los dominios transmembranales de la enzima o próximos a ellos (TM) ⁽⁴⁵⁾. El anexo 1 muestra el flujograma seguido en la investigación.

Aspectos éticos:

El protocolo de investigación fue aprobado por el Consejo Científico y la Comisión de Ética del CPGM-SS. La participación en la investigación fue voluntaria, para la cual los padres o tutores firmaron el consentimiento informado y además los investigadores establecieron un compromiso de confidencialidad referido a la información relacionada con la investigación (anexo 2).

Novedad científica:

1. Se hace una exhaustiva caracterización del fenotipo clínico en 21 pacientes, un amplio grupo si se considera la rareza de la enfermedad, cuyo diagnóstico fue posible por la combinación de acciones capacitantes, pesquisa por distintas vías y colaboración multidisciplinaria, interinstitucional e intersectorial, así como la aplicación de estudios bioquímicos.
2. Se incorpora en Cuba un marcador bioquímico para el diagnóstico del SLO, que junto a la implementación del estudio de algunas mutaciones en el gen DHCR7 permite no solo la confirmación de la enfermedad en pacientes con sospecha clínica, sino también la posibilidad de ofrecer un asesoramiento genético certero a las familias, con nuevas opciones como el diagnóstico prenatal y de portadores y el tratamiento a los enfermos; además por primera vez se utiliza el método de Kelley y Hennekam, internacionalmente empleado como evaluador de la severidad del fenotipo clínico.

3. Es el primer estudio molecular del SLO en Cuba, y de pacientes de origen hispano el primero que se publica.

El **aporte teórico** fundamental de esta investigación radica en mostrar elementos a favor de:

1. El amplio espectro fenotípico del SLO y la gran heterogeneidad alélica en el gen DHCR7 al encontrarse la mutación D234Y, no reportada en otros pacientes.
2. Un posible efecto de fundador de la mutación T93M en Cuba.
3. La interacción génica como probable causa de la holoprosencefalia (HPE) en el SLO.
4. La correlación entre el genotipo y los fenotipos bioquímico y clínico, al asociarse los genotipos TM/0 con niveles más bajos de colesterol, más altos de 7DHC y mayor severidad clínica de la enfermedad respecto a los genotipos TM/TM, a pesar de que ambos grupos genotípicos se asocian a formas ligeras y moderadas de la enfermedad.

El **aporte práctico** principal radica en:

1. La elevación del número de pacientes con sospecha clínica de la enfermedad.
2. La aplicación en Cuba de un método bioquímico que permite la confirmación del diagnóstico, piedra angular del asesoramiento genético, de lo que se derivó la posibilidad de tratamiento a los enfermos con alimentos ricos en colesterol para lo cual se incluyó en el Dietario Médico Nacional la dieta 39-ES.
3. La introducción en Cuba de técnicas para la caracterización de mutaciones en el gen DHCR7 que permite ofrecer el diagnóstico prenatal como una nueva opción reproductiva preventiva para parejas con un hijo previo afectado y ambas mutaciones identificadas (lo cual ya se realizó en una oportunidad en el propio país), así como el estudio de portadores a familiares de enfermos y las parejas de estos.
4. El establecimiento de un algoritmo para el diagnóstico y el asesoramiento genético de la enfermedad en el país.

Los principales resultados de la tesis que dan salida a los objetivos trazados se presentan en un documento único con cuatro capítulos que son: Marco teórico, Caracterización de los fenotipos bioquímico y clínico de pacientes con el síndrome de Smith Lemli Opitz, Caracterización genética del síndrome de Smith Lemli Opitz en Cuba y Correlación entre los fenotipos bioquímico y clínico y el genotipo DHCR7, en

los que se incluyen un conjunto de figuras y tablas que resumen los hallazgos principales que se discuten en el cuerpo de la memoria escrita y permiten arribar a las principales conclusiones científicas de la investigación. Se presentan además ocho secciones: abreviaturas utilizadas, síntesis, introducción, conclusiones, recomendaciones, referencias bibliográficas, autobibliografía y anexos.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes históricos

El síndrome de Smith Lemli Opitz (SLO) (Mc Kusick n.º 270400) ⁽¹⁾ fue descrito por primera vez en 1964 por David Smith, Luc Lemli y John Opitz ⁽⁵⁾, de quienes lleva su nombre, aunque también se conoce como síndrome RSH en alusión al apellido de los tres primeros casos reportados ⁽⁴⁶⁾, los cuales tenían en común retardo del desarrollo físico y mental, hipotonía, trastornos de la alimentación, dismorfia facial, malformaciones genitales y de extremidades. En ninguno de los pacientes existía consanguinidad parental y al tratarse de enfermos varones no podía definirse entre la herencia autosómica recesiva y recesiva ligada al X ⁽⁵⁾. Entre 1964 y 1994 fueron publicados alrededor de 340 trabajos que permitieron reconocer su herencia autosómica recesiva, pero que a la vez condujeron a una imagen incompleta y distorsionada del fenotipo, pues al no disponerse de exámenes de laboratorio que permitieran un diagnóstico certero se incluyeron pacientes con características similares pero de diferente etiología ⁽⁴⁷⁾. En esa época también se clasificó la enfermedad en tipo I (forma clásica) y tipo II (forma severa) ⁽⁴⁸⁾. Con el descubrimiento en 1993 del defecto metabólico causante del SLO ⁽⁶⁾ surgió la posibilidad de realizar pruebas diagnósticas, lo que permitió reconocer que los tipos I y II no eran más que gradaciones de un amplio espectro fenotípico, que en la actualidad se conoce que varía desde múltiples malformaciones mayores causantes de letalidad intrauterina hasta mínima dismorfia y retraso mental ligero ^(4,48). En 1998 se clona el gen DHCR7 e identifican las primeras mutaciones patogénicas ⁽¹⁰⁻¹³⁾, lo que también ha contribuido a la comprensión de la variabilidad de los fenotipos clínico y bioquímico y a la introducción de nuevas opciones preventivas en las familias ⁽¹⁶⁾.

1.2. Principales características clínicas

La mayoría de los recién nacidos son moderadamente pequeños al nacer y presentan severos trastornos de la alimentación (pobre succión, poco interés por los alimentos, dificultades para deglutir y/o vómitos), por lo que muchos necesitan alimentación por gavage o gastrostomía (15,49-52). La microcefalia puede ser evidente al nacer o instaurarse paulatinamente (15,50,51,53,54).

El retardo de desarrollo pondoestatural es casi universal incluso en aquellos niños con una ingesta calórica adecuada (15,55). La hipotonía es muy común en edades tempranas, posteriormente el tono va mejorando y en la infancia tardía puede haber hipertonía con contracturas en flexión de diferentes articulaciones, especialmente en niños que no caminan (15,19,49). Las infecciones son frecuentes, fundamentalmente las respiratorias altas, las neumonías y las otitis y tienden a disminuir con la edad. No se conoce una alteración inmunológica primaria que las explique (15,48).

El dismorfismo craneofacial comprende además de la microcefalia, estrechamiento bitemporal, ptosis palpebral, micrognatia, nariz corta con narinas en anteversión y depresión del puente nasal. Estas características pueden ser muy sutiles en algunos pacientes (48). Las orejas suelen ser grandes, de implantación baja y a veces en rotación posterior. Son muy frecuentes el estrabismo y la catarata congénita (15,49-51). La fisura del paladar, tanto duro como blando, o la hendidura submucosa está presente en más del 50 % de los casos (49-51,54,56,57). Otros hallazgos comunes son paladar alto y estrecho, hipercrecimiento de los arcos alveolares, rugosidad del paladar y malposición y maloclusión dentaria (5,48,49,51,58).

La sindactilia 2-3 de los pies es el defecto estructural más distintivo del SLO, que está presente en más del 95 % de los pacientes, incluidos los casos más ligeros. Es una sindactilia membranosa que frecuentemente tiene forma de Y pero que puede ser total o mínima (49,51,58,59). La polidactilia postaxial de manos y/o pies se presenta en alrededor del 50 % de los casos y son comunes también la implantación proximal del pulgar, la braquidactilia y la clinodactilia (15,16,50,51,53,54,58).

Las malformaciones de órganos internos suelen ocurrir en los casos más graves y pueden afectar a todos los sistemas. Dentro de las más comunes se encuentran: agenesia o hipoplasia del cuerpo calloso,

hipoplasia cerebelar, PCA, CIA, CIV, CAV, CoA, defectos de segmentación pulmonar, estenosis hipertrófica del píloro, agangliosis intestinal y agenesia e hipoplasia renal (48,50,51,54,58,60).

El retardo del desarrollo sicomotor y/o retraso mental son constantes y de severidad variables. Es característico el déficit severo en el desarrollo del lenguaje, fundamentalmente activo, y las alteraciones de la conducta (2,3,49-51,54,61,62), muchas de las cuales se incluyen dentro del espectro autista (61,62-65). Un estudio reciente encontró relación entre la frecuencia de los trastornos conductuales con los niveles de colesterol (66). A pesar de ser comunes las alteraciones electroencefalográficas, la epilepsia es una condición rara (67).

Para estimar la severidad clínica de la enfermedad se emplea una escala propuesta por Kelley y Hennekam en el año 2000, que evalúa 10 estructuras anatómicas (anexo 3) (15). El grado de defectos físicos no se correlaciona con la severidad de los trastornos conductuales, que ocurren hasta en los pacientes menos afectados físicamente (3).

No se encontraron estudios sobre la esperanza de vida en esta enfermedad pero hay elementos que sugieren que la supervivencia está muy relacionada con la gravedad de los defectos viscerales (2,48,68) y por supuesto, con los cuidados médicos y familiares que reciba.

1.3. Defecto bioquímico y genética molecular

A partir de la década de los 80 del pasado siglo algunos trabajos sugirieron una posible asociación del SLO con trastornos del metabolismo lipídico (15). En 1993 Irons y cols. (6) reportaron en pacientes con diagnóstico clínico de SLO bajas concentraciones en plasma y heces fecales de colesterol e incremento del precursor 7DHC y de un segundo esterol hasta ese momento no identificado y que posteriormente fue reconocido como el 8DHC, un isómero del 7DHC. Ante estos hallazgos los autores sugirieron un defecto de la enzima 7DHCR que cataliza el último paso en la vía de síntesis del colesterol de Kandutsch-Russell (anexo 4). Nuevas evidencias que apoyaron este descubrimiento provinieron de estudios posteriores en otros tejidos de pacientes con SLO (7,69).

La 3 β -hidroxiesterol Δ^7 reductasa (7DHCR, EC 1.3.1.21) está compuesta por 475 aa y tiene un peso molecular de 54,5 kDa. Se asocia por nueve dominios a la membrana del retículo endoplásmico, realizando

allí la saturación del doble enlace C7-C8 en la ruta de biosíntesis del colesterol de Kandutsch-Russell. Forma también 4 lazos citoplasmáticos y un lazo en la luz del retículo endoplásmico, su extremo N-terminal se orienta hacia el citoplasma y el C-terminal hacia la luz del retículo endoplásmico (anexo 5) ⁽⁷⁰⁾.

El gen que codifica la enzima 7DHCR, conocido como DHCR7, fue mapeado y clonado en 1998 ⁽¹⁰⁾. Se localiza en 11q13.2-q13.5, alcanza aproximadamente 14 kb, contiene ocho intrones y nueve exones y el codón de inicio de la traducción se ubica en el exón tres. Se expresa tanto en la vida fetal como en la adultez en múltiples tejidos, especialmente en las glándulas suprarrenales, hígado y cerebro ⁽¹⁴⁾. En el propio año 1998 tres grupos independientes identificaron las primeras mutaciones en pacientes con SLO ⁽¹¹⁻¹³⁾, que en la actualidad suman más de 150, la mayor parte de las cuales son mutaciones con sentido que ocasionan inestabilidad de la proteína, pero con conservación de actividad enzimática residual ^(4,14,71).

Existen diferencias notables en la frecuencia de las mutaciones en las diversas poblaciones que han sido explicadas por la ocurrencia de efecto de fundador, deriva genética, flujo genético y mutaciones recurrentes ^(53,72-78). De manera global, la mutación más comúnmente reportada, que representa el 30 % de los alelos, es IVS8-1G>C; en orden de frecuencia le siguen: T93M, W151X, V326L y R404C. El conjunto de estas cinco mutaciones constituyen alrededor del 60 % de los alelos mutados, mientras las restantes se reportan en un único paciente o en un pequeño grupo de ellos ^(3,14,16).

El gran número de mutaciones identificadas y el hecho de que la mayoría de los pacientes son heterocigotos compuestos dificultan el análisis de la correlación entre el genotipo y los fenotipos bioquímico y clínico. En sentido general, los genotipos formados por alelos nulos en homocigosis u heterocigosis compuesta se correlacionan con los niveles más elevados de 7DHC y más bajos de colesterol y con un mayor grado de severidad clínica, mientras que los genotipos constituidos por mutaciones con sentido que afectan a los dominios transmembranales se asocian a los fenotipos más leves ^(14,53). Sin embargo, algunos pacientes con igual genotipo DHCR7 (incluso hermanos) se diferencian en la gravedad de la enfermedad, lo cual sugiere que otros factores genéticos tanto fetales como maternos y/o ambientales contribuyen en la expresión fenotípica ^(2,4,53,71,79-81).

1.4. Diagnóstico

La característica bioquímica distintiva del SLO es el incremento del 7DHC, un metabolito prácticamente indetectable en personas sanas, pero que típicamente se incrementa más de 50 veces en pacientes con SLO ⁽⁴⁾. La determinación del 7DHC se realiza en plasma, suero u otros tejidos, fundamentalmente por medio de CG/EM u otras técnicas como la cromatografía líquida/espectroscopía de masa en tándem y la espectroscopía ultravioleta ^(4,9,82,83). La cromatografía de capa fina (CCF) ofrece la posibilidad de separar los esteroides y es una alternativa tecnológicamente sencilla para la detección de la enfermedad ⁽⁸³⁾.

La determinación de los niveles de colesterol no es confiable para el diagnóstico porque alrededor del 10 % de los pacientes con SLO tienen niveles normales de colesterol a cualquier edad ^(15,48,84). Por otra parte, las técnicas convencionales de cuantificación del colesterol que se emplean en el laboratorio clínico no son útiles, debido a que los metabolitos precursores acumulados reaccionan junto al colesterol, por lo que los laboratorios clínicos pueden reportar valores normales de colesterol cuando realmente hasta más de la mitad de los esteroides medidos pudieran corresponder al 7DHC y 8DHC ^(7,48,59,85).

En algunos casos con un fenotipo clínico muy ligero se encuentran cifras límites de 7DHC, por lo que se requiere para una definición diagnóstica la cuantificación de este metabolito luego del cultivo celular en un medio carente de colesterol que induzca su síntesis endógena o el estudio de las mutaciones en el gen DHCR7 ^(3,48,53,84).

Ocasionalmente se observan ligeras elevaciones de 7DHC en pacientes sin SLO que tienen incremento de la síntesis de colesterol, xantomatosis cerebrotendinosa o que llevan tratamiento con algunos medicamentos (fundamentalmente psicofármacos), elementos que deben tenerse en cuenta en la evaluación de los enfermos ^(3,15,48,86,87).

La identificación de dos mutaciones en el gen DHCR7 también permite hacer el diagnóstico. Dado que el análisis molecular tiene un elevado costo se han establecido estrategias para reducirlo, considerando las regiones génicas donde se ubican la mayoría de las mutaciones conocidas y la frecuencia de las mismas en las diversas regiones geográficas ^(3,4,68).

El diagnóstico de portadores se realiza por técnicas moleculares ⁽¹⁶⁾, mientras que el prenatal puede hacerse tanto por los métodos bioquímicos como moleculares descritos con anterioridad, en muestras de líquido amniótico, vellosidades coriónicas u otros tejidos fetales ^(4,26,27,48,88,89).

En embarazos de fetos con SLO se sintetizan en la placenta esteroides anormales derivados del 7DHC; la detección de estos en la orina de la gestante es un método no invasivo pero todavía no generalizado para el diagnóstico prenatal de la enfermedad ^(90,91).

Por el modo de herencia del SLO las parejas con un hijo afectado tienen un riesgo de recurrencia en cada embarazo del 25 %, siendo este el motivo fundamental de realización del diagnóstico prenatal. Otros criterios de indicación son la identificación por US de crecimiento intrauterino retardado (CIUR) y malformaciones congénitas y/o bajos niveles de estriol no conjugado en pesquisas bioquímicas del segundo trimestre del embarazo ^(16,58,92-97).

1.5. Epidemiología

La frecuencia estimada oscila entre 1/10 000 y 1/70 000 nacidos vivos en poblaciones de origen caucásico, la más alta corresponde a la República Checa y Eslovaquia. El SLO parece ser una enfermedad mucho más rara entre asiáticos, árabes y africanos ^(15,51,59,72,98-102).

A partir de estudios de las mutaciones más comunes en diferentes poblaciones caucásicas, se ha estimado una frecuencia general de portadores de 2-3 %, lo que implicaría una incidencia mucho más alta y según lo cual sería una de las enfermedades autosómicas recesivas más comunes ^(72,103-107). Dos investigaciones recientes basadas en la secuenciación del gen DHCR7 en habitantes norteamericanos de diversos orígenes étnicos, encontraron una frecuencia general de portadores de 1,01 % y 1,5 % ⁽¹⁰⁸⁻¹⁰⁹⁾.

Existe una discrepancia entre la incidencia observada y la esperada de SLO (basada en la estimación de la frecuencia de portadores), que parece deberse a los casos no diagnosticados a causa de fenotipos muy ligeros y los abortos, pérdidas fetales o neonatales resultantes de los fenotipos más graves. En este último grupo podrían encontrarse los genotipos homocigotos para mutaciones nulas, cuya frecuencia en pacientes diagnosticados postnatalmente está por debajo de lo esperado ^(4,14,48,110-112).

La rareza de la consanguinidad entre los padres de los enfermos y la existencia de varios reportes en los que más de un miembro de la familia (no hermanos) están afectados son también elementos a favor de que la frecuencia de portadores es relativamente alta ^(59,110). Es probable que exista una ventaja de los heterocigotos, pero aún no se dispone de datos que confirmen esta hipótesis ⁽⁴⁾.

1.6. Fisiopatología

A pesar del conocimiento del defecto primario causante del SLO, los mecanismos que dan lugar a las manifestaciones clínicas no están totalmente dilucidados y son motivo de numerosas investigaciones. Es muy probable que existan varios procesos fisiopatológicos involucrados relacionados con las múltiples funciones biológicas del colesterol y con el posible efecto tóxico del 7DHC y el 8DHC y/o de los metabolitos derivados de estos (anexo 6) ^(3,4,46,48,113).

1.6.1. Participación del colesterol en la embriogénesis

El colesterol interviene en la vía de señalización de Shh. La proteína Shh sufre modificaciones posteriores a la traducción caracterizadas por la autoproteólisis y la unión de una molécula de colesterol en su extremo C-terminal y otra de ácido palmítico en el extremo N-terminal. De esta manera se convierte en una molécula activa que fluye desde la célula donde se sintetizó hacia células diana en las cuales se une a Patched (Ptch), una proteína transmembranal que es su receptor y que tiene dominios sensibles a los esteroides. La unión de Shh a Ptch inactiva a la segunda, lo que a su vez ocasiona que se reprima la inhibición que Ptch ejerce sobre Smoothened (Smo), otra proteína transmembranal que libera señales al citoplasma, resultando en la activación de factores de transcripción en dedos de zinc, como los genes Gli-2 y Gli-3, que a su vez controlan la expresión de genes diana de Shh entre ellos Gli-1 y Patch1. Shh es un morfógeno, una molécula que difunde para crear un gradiente de concentración y tiene diferentes efectos en las células del embrión en desarrollo dependiendo de su concentración ^(114,115).

A continuación se hará referencia a la participación de Shh en la morfogénesis de algunas estructuras anatómicas que permita comprender cómo la interferencia en esta vía de señalización se relaciona con malformaciones congénitas frecuentes en el SLO.

Cráneo y cara:

Durante el desarrollo craneofacial, la transformación de las células pluripotenciales de la cresta neural en complejas estructuras tridimensionales requiere de una estrecha y coordinada interacción de genes y tejidos, que es altamente dependiente del momento de desarrollo en el cual la información es recibida. Un mecanismo por el que las moléculas señalizadoras, tales como Shh, controlan el patrón de desarrollo de la cara es a través de la organización de centros e interacciones epitelio-mesénquima. La proteína Shh secretada por esos centros organizadores pueden establecer concentraciones o gradientes-actividad dependientes que determinan diferentes tipos de células e información posicional. Shh puede actuar directamente sobre células diana para producir diferentes respuestas celulares; por ejemplo, la placa mesodérmica precordial subyacente al cerebro anterior es una fuente de Shh para el desarrollo de esa estructura. En el cerebro anterior ventral Shh tiene una influencia significativa en la morfogénesis del primordio frontonasal, del cual se desarrollan las partes superior y media de la cara. El endodermo también tiene función en la morfogénesis de la cabeza, y este parece ser también una fuente de señalización Shh. Además existen evidencias de que Shh está involucrada en el desarrollo del cerebelo, el esqueleto craneofacial, los ojos, el oído interno, el paladar, los dientes, la lengua, las papilas gustatorias, las glándulas submandibulares y los folículos pilosos ⁽¹¹⁵⁻¹¹⁹⁾.

Extremidades:

Al final de la cuarta semana de desarrollo se hacen visibles los esbozos de las extremidades como yemas o brotes mesenquimatosos en la pared ventrolateral del cuerpo; a las seis semanas los extremos de las yemas de las extremidades se tornan aplanadas o en forma de remos para formar las placas de las manos y de los pies; los dedos se forman cuando la cresta ectodérmica apical se divide en cinco partes o segmentos; la formación definitiva de los dedos se produce por el crecimiento continuado de los cinco segmentos de la cresta epidérmica, la condensación del mesénquima para formar los rayos digitales cartilagosos y por la muerte de los tejidos interpuestos entre esos rayos (las membranas interdigitales) donde desempeña una función importante la apoptosis o muerte celular programada. Es decir, el desarrollo

de las extremidades involucra a procesos muy coordinados caracterizados por un constante equilibrio entre la actividad mitótica celular y la apoptosis, en la que intervienen múltiples genes, entre ellos SHH ^(120,121).

Shh actúa como un morfógeno que es secretado desde una región del mesénquima posterior, llamada zona de actividad polarizante, que establece el patrón de dedos en una dirección posterior a anterior. La expresión témporo-espacial de ese patrón es esencial para la regulación del número de dedos y la identidad individual de cada uno. Sin esa precisa regulación se compromete el patrón de desarrollo de las extremidades ^(116,120,122-125).

La sindactilia ocurre principalmente por alteraciones de la diferenciación de tejidos adyacentes entre los dedos debidos a un fallo de la apoptosis en el mesénquima interdigital entre las semanas siete y ocho, cuyos mecanismos no son bien entendidos, a pesar de los avances en el conocimiento de la clínica y de los genes implicados en algunas de sus variantes ^(126,127). La sindactilia 2-3 es un hallazgo muy interesante en el SLO por ser la anomalía física que se presenta con mayor frecuencia y que ocurre también en ratones de experimentación a los que se les muta el gen DHCR7 ⁽⁴⁾.

Genitales:

La diferenciación sexual es un proceso muy complejo y en el cual intervienen múltiples genes ⁽¹²⁸⁾.

La formación de las estructuras genitales parte de una etapa indiferenciada que es semejante en ambos sexos. La presencia del cromosoma Y es esencial para la diferenciación de los genitales masculinos, pues en su brazo corto se localiza el gen SrY (codificante del factor determinante del testículo) que desencadena una cascada de interacciones génicas que permite la diferenciación de la gónada primitiva en testículo ^(129,130). Este producto génico es un factor de transcripción que induce la expresión de otros genes que conllevan a la diferenciación de las células de Sertoli, en las que se produce la sustancia inhibidora mülleriana que provoca la regresión de los conductos paramesonéfricos o de Müller. Por otra parte, la testosterona en altas concentraciones (sintetizada a partir del colesterol en las células de Leydig) es responsable de la diferenciación de los conductos de Wolff en epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales en el primer trimestre. También la testosterona es convertida en dihidrotestosterona que es la principal responsable de la virilización del seno urogenital y del tubérculo genital, a partir de los que se

forman los genitales externos ^(129,131,132). La testosterona y la dihidrotestosterona se unen a receptores celulares específicos y desencadenan la transcripción de otros genes cuyos productos están directamente implicados en la diferenciación de los genitales masculinos ^(129,133). Dentro de esos genes se encuentra SHH, cuyo producto génico, Shh, actúa como un modulador entre la proliferación y la apoptosis. Estudios inmunohistoquímicos en penes de fetos humanos muestran la expresión del gen SHH, su receptor Ptch y otras proteínas derivadas de la activación del receptor Smo ⁽¹³⁰⁾.

La alta frecuencia de anomalías genitales en varones con SLO sugiere un importante rol del déficit de colesterol como precursor de la síntesis de testosterona y en la activación de Shh también implicada en este proceso.

Otras estructuras anatómicas:

Existen estudios que han demostrado por técnicas inmunohistoquímicas la presencia de Shh y otras proteínas que participan en la vía de señalización de Shh en distintos estadios de desarrollo del sistema urinario tanto en ratones como en humanos ⁽¹³⁴⁾.

Además, investigaciones en humanos y en ratones revelan que Shh es uno de los múltiples factores derivados del endodermo pulmonar y que son críticos para la ramificación de los bronquios y la formación del epitelio y del músculo liso peribronquial ^(135,136).

En el corazón la proteína Shh participa en la regulación de la asimetría izquierda/derecha ^(116,137).

Como se ha explicado hasta aquí, la deficiencia de colesterol puede interferir en la activación de Shh, sin embargo no debe ser este el único factor causante de la disfunción de la vía de señalización de Shh si se tiene en cuenta la transferencia de colesterol desde la madre al feto a través de la placenta desde estadios tempranos de la gestación ⁽¹³⁸⁾. Además, aunque varios estudios han encontrado cierta correlación entre los niveles de colesterol y 7DHC con la severidad clínica (que se basa fundamentalmente en aspectos anatómicos), también hay inconsistencias en este sentido que hacen pensar que otros mecanismos pueden estar involucrados en la embriogénesis anormal en el SLO. Experimentos en animales sugieren que precursores del colesterol de 27 carbonos como el 7DHC y el latosterol pueden sustituir al colesterol en la activación de Shh y que el defecto pudiera estar en la interacción con Ptch y Smo ⁽²⁾, lo que a su vez

podría explicar el porqué otras enfermedades causadas por deficiencias enzimáticas en la vía de síntesis del colesterol como la *latosterolosis* y la *desmosterolosis*, a pesar de tener cifras normales de este metabolito tienen en común con el SLO varias malformaciones congénitas ⁽⁸⁾. Los trastornos del metabolismo del colesterol también podrían tener un efecto directo sobre *Ptch*, que actúa como receptor de otras proteínas de la familia *Hedgehog*, como *Indian* y *Desert Hedgehog*. La primera se expresa en los condrocitos y osteoblastos y en las células de la cresta neural y la disrupción de su función ocasiona *rizomelia* y *megacolon agangliónico*; la segunda se expresa en las células de *Leydig* y se asocia a *criptorquidia*, *hipospadia* y trastornos de la diferenciación sexual. Todas estas malformaciones forman parte del espectro fenotípico del SLO ^(139,140,141). Otros posibles mecanismos pudieran ser un efecto regulador directo sobre la vía de señalización de *Shh* de los *oxiesteroles* y la enzima *7DHC*, alteraciones de la membrana y de la interacción entre las células y dificultades en el transporte intracelular de *Shh* secundario a la deficiencia de colesterol ^(57,114,116,140-143). Tampoco se puede descartar que algunas malformaciones presentes en el SLO resulten de la interferencia en procesos embriológicos independientes a la vía de señalización de *Shh* ⁽¹³⁹⁾.

1.6.2. Otras funciones del colesterol y su posible relación con las manifestaciones clínicas

Además de la participación en la embriogénesis, el colesterol es el precursor para la síntesis de hormonas esteroideas, esteroides neuroactivos, *oxiesteroles* y *ácidos biliares* y forma parte de las membranas celulares.

Como se explicó en el acápite anterior el déficit de *testosterona* y *dihidrotestosterona* es, al menos en parte, responsable de los trastornos del desarrollo sexual en los varones ^(128,131-133).

Los *mineralocorticoides* y *glucocorticoides* se producen también a partir del colesterol y aunque el déficit de dichas hormonas puede producir manifestaciones clínicas en pacientes con SLO, la insuficiencia suprarrenal aguda en situaciones de estrés es rara, excepto en enfermos con fenotipo severo ^(2,16,144).

En los pacientes con SLO se encuentran esteroides anormales derivados del *7DHC* y el *8DHC*, referidos antes por su utilidad en el diagnóstico prenatal, cuya función en el organismo es desconocida ^(2,90,91).

Los neuroesteroides participan en la neurogénesis, neuroprotección y mielinización ^(145,146). No se conoce con exactitud el grado de afectación de las funciones biológicas de estas sustancias esteroideas sintetizadas a partir del 7DHC y el 8DHC, pero parecen al menos estar relacionados con los trastornos cognitivos y conductuales, como se verá en el acápite 1.7. Un estudio reciente encontró una disminución de neurotransmisores en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con SLO ⁽¹⁴⁷⁾.

Los oxisteroles son derivados oxidados de los esteroides que en los humanos tienen múltiples funciones biológicas, entre ellas participar en la homeostasis del colesterol, en el metabolismo de los esfingolípidos, en la agregación plaquetaria, en la apoptosis y en la prenilación de las proteínas ⁽¹⁴⁸⁾. El 7DHC es una sustancia 200 veces más reactiva que el colesterol y el perfil de productos oxidados que se derivan de él es mucho más amplio. El mecanismo por el que actúan estos oxisteroles no se conoce con exactitud pero se piensa que, entre otras cosas, pueden ser causantes de citotoxicidad, inducir la apoptosis, modular la respuesta inmune, interferir en la estructura y función de las membranas celulares y actuar sobre la vía de señalización de Shh ⁽¹⁴⁹⁻¹⁵⁸⁾.

La deficiencia de ácidos biliares ocurre en casos severos de SLO, no así en pacientes con fenotipos ligero y moderado. Se han identificado ácidos biliares anormales derivados del 7DHC y el 8DHC, pero no se comprende su importancia clínica ⁽⁴⁾.

Además, el colesterol es un componente de las membranas celulares (fundamentalmente de la mielina) que participa en la formación de las balsas lipídicas implicadas en la transducción de señales, la permeabilidad y la fluidez de las membranas. La sustitución del colesterol por el 7DHC ocasiona una organización atípica de la membrana, según estudios de difracción de RX, así como cambios en sus propiedades físico-químicas y secundariamente de sus funciones ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶⁵⁾.

Actualmente se desarrolla una intensa actividad investigativa a través de modelos animales, dirigida a lograr una mayor comprensión del efecto pleiotrópico de las mutaciones en el gen DHCR7 y de la fisiopatología del SLO, de lo que se podrían derivar acciones terapéuticas más efectivas.

1.7. Tratamiento

Una vez definido el defecto de la vía metabólica causante del síndrome se hipotetizó que aportando una fuente exógena de colesterol se podría incrementar la concentración de este y disminuir la síntesis endógena de 7DHC, a través de la regulación de la vía metabólica por la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), por lo que el aporte de colesterol dietético (fundamentalmente yema de huevo) y/o como preparado medicamentoso se convirtió en el tratamiento estándar ^(2,4). Varios estudios han mostrado una mejoría de los parámetros bioquímicos después de iniciado el tratamiento ^(16,18,19,166-169). Se refieren beneficios en el desarrollo físico y sicomotor, conducta, audición, fotosensibilidad, síntomas gastrointestinales, polineuropatía y frecuencia y respuesta a las infecciones ^(16,18,21,168). Los cambios en la conducta son difíciles de explicar por la acción directa del colesterol sobre el SNC, ya que este no atraviesa la barrera hematoencefálica ⁽¹⁶⁴⁾, pero sí podría ocurrir por un efecto indirecto de otros metabolitos como los esteroides neuroactivos o los oxisteroles o por la acción sobre las células endoteliales de los capilares cerebrales ⁽⁴⁾. Existen pocos estudios controlados, por lo que se requiere investigar más para determinar la verdadera eficacia del tratamiento con colesterol ^(17,167,169) del que no se han observado efectos adversos ^(4,16).

A pesar de que pueden existir problemas en la síntesis normal de ácidos biliares, la malabsorción de grasas y vitaminas liposolubles es rara, por lo que los ácidos biliares no se emplean habitualmente ⁽¹⁷⁾.

Se puede aportar colesterol a través del plasma fresco en enfermos que por determinadas razones no pueden alimentarse ⁽²⁰⁾ y también en pacientes con fenotipo severo y que por enfermedad grave u otra situación de estrés puedan desarrollar insuficiencia suprarrenal aguda ^(16,144).

Con el propósito de reducir la síntesis endógena del 7DHC en el SNC se ha ensayado el empleo de sinvastatina en el tratamiento ya que este medicamento cruza la barrera hematoencefálica. Debido a que los resultados son controversiales, la sinvastatina no es una alternativa terapéutica aceptada ^(17,166,170).

Investigaciones en animales evidencian el rol del estrés oxidativo en el SLO, por lo que se han realizado también estudios en cultivos de fibroblastos de pacientes y de animales que muestran que el tratamiento con antioxidantes (vitaminas A, C y E y coenzima Q10) reducen la formación de productos oxidados

derivados del 7DHC. No obstante, todavía se requieren más investigaciones para determinar las dosis, modo de empleo y la seguridad de dicho tratamiento, cuya finalidad sería aliviar los síntomas postnatales de la enfermedad ^(47,171,172).

Otras áreas potenciales de investigación en la esfera terapéutica son: la administración directa de colesterol al cerebro, el desarrollo de esteroides sintéticos que atraviesen la barrera hematoencefálica u ocasionar la disrupción parcial de la misma, el suplemento prenatal de colesterol, el trasplante al cerebro de células madres neurales y la terapia génica ^(17,47,173).

En resumen, el SLO es un error congénito del metabolismo del colesterol causante de malformaciones congénitas y retraso mental, que puede ser diagnosticado con certeza por métodos bioquímicos y moleculares tanto postnatal como prenatalmente y que es potencialmente tratable. La identificación del fenotipo clínico de los pacientes es sin dudas el primer elemento para conducir al diagnóstico definitivo y al adecuado asesoramiento genético. Además, el estudio de los casos con SLO ayuda a comprender cómo participan diferentes moléculas en el funcionamiento humano, lo que representa una contribución a las ciencias médicas.

CAPÍTULO 2.

CARACTERIZACIÓN DE LOS FENOTIPOS BIOQUÍMICO Y CLÍNICO DE PACIENTES CON EL SÍNDROME DE SMITH LEMLI OPITZ

CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS FENOTIPOS BIOQUÍMICO Y CLÍNICO DE PACIENTES CON EL SÍNDROME DE SMITH LEMLI OPITZ

2.1. Introducción

Los síndromes con desviaciones de la morfogénesis son numerosos y heterogéneos, su diagnóstico se basa en el valor de las descripciones clínicas que incluyen desde defectos congénitos mayores hasta signos dismórficos y manifestaciones de disfunción en múltiples sistemas orgánicos. La variabilidad clínica con que se manifiestan y la existencia de características comunes a varios de ellos, pueden generar errores en el diagnóstico o incluso a que este no se logre realizar. En el caso específico del SLO, la comprensión del defecto metabólico que lo causa permite la realización de estudios para reconocer el fenotipo a nivel bioquímico y con ello la confirmación del diagnóstico, lo que además posibilita profundizar en el conocimiento del fenotipo clínico e introducir nuevos elementos en el asesoramiento genético. Antes del inicio de esta investigación el diagnóstico del SLO en Cuba se basaba en características dismórficas y alteraciones del neurodesarrollo clásicas, por lo que es probable que no se sospechara la enfermedad en los pacientes con fenotipos clínicos extremos o se hiciera en otros pacientes con características similares pero de diferente etiología.

2.2. Objetivos

1. Seleccionar pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO.
2. Reconocer el fenotipo bioquímico del SLO en pacientes con fenotipo clínico sugestivo de la enfermedad.
3. Caracterizar el fenotipo clínico de los pacientes con SLO.

2.3. Materiales y métodos

El flujograma general seguido en esta tarea de investigación se muestra en el anexo 7.

2.3.1. Establecimiento de los criterios para la selección de pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO

Los criterios de sospecha clínica utilizados fueron determinados por la autora y el equipo de trabajo del CPGM-SS a partir de la revisión de la literatura y de la selección de los signos referidos como más frecuentes en la enfermedad, puesto que no se han establecido internacionalmente criterios para el diagnóstico clínico⁽¹⁶⁾. En los acápites 2.3.3.1, 2.3.3.2 y 2.3.3.3 se refieren los criterios diagnósticos fijados para cada una de las vías utilizadas en la selección de los pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO.

2.3.2. Capacitación a los profesionales involucrados

Al inicio de la investigación y durante el transcurso de esta se realizaron acciones de capacitación dirigidas a genetistas clínicos, asesores genéticos y otros especialistas (de todas las provincias) con el propósito de elevar el nivel de sospecha clínica de la enfermedad y seleccionar a los pacientes con fenotipo sugestivo de SLO considerando los criterios establecidos para cada vía, así como los requisitos para la toma de las muestras de sangre para el posterior estudio en el laboratorio, la recolección de la información clínica y el empleo del consentimiento informado. La capacitación se realizó a través de conferencias en varios cursos nacionales sobre errores innatos del metabolismo y de Genética Clínica, presentación de trabajos sobre el tema en eventos científicos nacionales, comunicación directa con los especialistas y publicación de dos artículos en la Revista Cubana de Genética Humana^(174,175).

2.3.3. Vías y procedimientos para la selección de pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO

2.3.3.1. Pacientes con diagnóstico clínico de SLO antes del inicio de la investigación

De conjunto con los especialistas en Genética Clínica se revisaron los registros de más 30 años del servicio de esa especialidad en el Hospital Pediátrico William Soler y de alrededor de 20 años considerando todo el periodo de funcionamiento de estos servicios en el resto de las provincias del país, incluyendo los demás de la capital.

Se consideraron fenotipos clínicos sugestivos de SLO todos aquellos pacientes en que se había planteado ese

diagnóstico, independientemente de las características clínicas presentes en el momento de esta investigación.

2.3.3.2. Pesquisa en instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual

La pesquisa fue realizada por la autora y el equipo de trabajo del CPGM-SS en 16 instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual, de ellas 13 centros sicopedagógicos (CSP), una escuela especial, un círculo infantil y una clínica, de seis provincias del país (La Habana, Villa Clara, Cienfuegos, Sancti Spíritus, Ciego de Ávila y Las Tunas) donde fueron examinados 1 224 personas.

La identificación de fenotipos clínicos sugestivos de SLO se hizo sobre la base de los siguientes criterios:

- Pacientes con retraso mental y sindactilia 2-3 de los pies y al menos uno de los siguientes signos:

Microcefalia

Peso y talla por debajo del 10.^{mo} percentil

Trastornos de la conducta (alguno de los siguientes: autolesión, irritabilidad, trastornos del sueño, hiperreactividad táctil, a los ruidos o a la luz; agresividad, movimientos estereotipados del cuerpo, fijación con objetos, hiperactividad)

Dismorfia facial (alguno de los siguientes: nariz corta con narinas en anteversión, ptosis palpebral, micrognatia, estrechamiento bitemporal)

Anomalías genitales en varones (alguno de los siguientes: hipospadia, criptorquidia, pene pequeño, genitales ambiguos)

Defectos congénitos de órganos internos

2.3.3.3. Pacientes atendidos en los servicios de Genética Clínica del país luego del inicio de la investigación

La selección fue realizada entre los pacientes atendidos en los servicios de Genética Clínica del país por parte de los especialistas que han laborado en los mismos durante los 11 años de la investigación.

Los criterios propuestos para identificar fenotipos clínicos sugestivos de SLO fueron:

- Recién nacidos o lactantes con al menos tres de los siguientes signos:

Sindactilia 2-3 de los pies

Hipotonía

Trastornos de la alimentación (alguno de los siguientes: pobre succión, desinterés por los alimentos, vómitos o reflujos)

Microcefalia

Dismorfia facial (alguno de los siguientes: nariz corta con narinas en anteversión, ptosis palpebral, micrognatia, estrechamiento bitemporal)

Anomalías genitales en varones (alguno de los siguientes: hipospadia, criptorquidia, pene pequeño, genitales ambiguos)

Defectos congénitos de órganos internos

Peso y talla por debajo del 10.^{mo} percentil

- Pacientes mayores de un año con retraso mental o del desarrollo sicomotor con al menos dos de los siguientes signos:

Sindactilia 2-3 de los pies

Microcefalia

Peso y talla por debajo del 10.^{mo} percentil

Trastornos de la conducta (alguno de los siguientes: autolesión, irritabilidad, trastornos del sueño, hiperreactividad táctil, a los ruidos o la luz; agresividad, movimientos estereotipados del cuerpo, fijación con objetos, hiperactividad)

Dismorfia facial (alguno de los siguientes: nariz corta con narinas en anteversión, ptosis palpebral, micrognatia, estrechamiento bitemporal)

Anomalías genitales en varones (alguno de los siguientes: hipospadia, criptorquidia, pene pequeño, genitales ambiguos)

Defectos congénitos de órganos internos

2.3.3.4. Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio los pacientes que a pesar de cumplir los criterios clínicos planteados en 2.3.3.2 y 2.3.3.3 tienen diagnóstico de una aberración cromosómica, otro síndrome monogénico o debido al efecto de factores ambientales durante la gestación, así como aquellos pacientes cuyos padres o tutores no dieron su consentimiento para participar en la investigación.

2.3.4. Reconocimiento del fenotipo bioquímico del SLO en pacientes con fenotipo clínico sugestivo de la enfermedad

2.3.4.1. Muestra

Fueron estudiados un total de 77 pacientes con fenotipo sugestivo de SLO; de ellos 11 tenían diagnóstico antes del inicio de la investigación, nueve provenían de la pesquisa a instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual y 57 de los sospechados en los servicios de Genética Clínica luego del inicio de la investigación. Cuatro pacientes de los identificados entre los que tenían diagnóstico clínico antes del inicio de la investigación no fueron estudiados por haber fallecido.

2.3.4.2. Procedimiento para la obtención, procesamiento y conservación de muestras de sangre

La toma de muestra de sangre se realizó con jeringuilla desechable siguiendo los procedimientos estandarizados y las normas de bioseguridad establecidas ⁽¹⁷⁶⁾. En niños grandes y adultos se extrajeron 10 mL de sangre, mientras que en niños muy pequeños o pacientes con muy mal estado físico se tomaron 4-5 mL, según criterios clínicos. Las muestras se coleccionaron en tubos con 250 µL de K₃EDTA al 6 %, luego se

centrifugaron y el plasma obtenido se congeló en tubos Eppendorf hasta el momento de realizarse el estudio bioquímico.

Se elaboró un instructivo para minimizar los perjuicios a los pacientes y garantizar la calidad en la obtención y conservación de las muestras (anexo 8).

2.3.4.3. Procedimiento para el análisis de esteroides

2.3.4.3.1. Etapa I

Se realizó en el periodo comprendido entre los años 2001 y 2004 e incluyó a 21 pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO, de ellos ocho provenían de los diagnosticados antes del inicio de la investigación, tres de la pesquisa a instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual y 10 sospechados en los servicios de Genética Clínica luego del inicio de la investigación.

Todos los pacientes fueron estudiados tanto por CCF como por CG/EM.

2.3.4.3.1.1. Análisis de esteroides por CCF

Se realizó en el laboratorio del CPGM-SS y se procedió del siguiente modo ⁽⁸³⁾:

Los esteroides se extrajeron a partir de 500 µL de plasma sanguíneo, se saponificó con 6 mL de NaOH etanólico 1 M en baño de maría a 60 °C por una hora. Posteriormente se extrajeron con 6 mL de hexano (Merck). Se centrifugó a 1 000 rpm por 5 min, se colectó la fase superior y se lavó con agua destilada, se centrifugó nuevamente, se tomó la fase orgánica y se dejó evaporar el solvente hasta sequedad bajo campana, cuidando no exponer la muestra a la luz intensa. Se diluyeron los esteroides extraídos en 100 µL de cloroformo hasta su uso.

Para la determinación cualitativa de los esteroides extraídos se procedió a la CCF. Se prepararon las placas de sílicagel 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 dejaron secar al aire por 10 min y luego una hora a 100 °C.

Se aplicaron 30 μ L. Se dejaron correr 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 rociador de H₂SO₄ al 20 %. Las placas se secaron al horno por 20 min a 100 °C.

Se determinó el Rf y se comparó con el esperado en estas condiciones que para colesterol, 7DHC y 8DHC resultan ser 0,73; 0,32 y 0,57 respectivamente.

Todas las sustancias químicas empleadas en el estudio tienen calidad de reactivo.

2.3.4.3.1.2. Análisis de esteroides por CG/EM

Se efectuó en la Universidad McMaster de Canadá, para lo cual las muestras de plasma fueron trasladadas refrigeradas por vía aérea. El estudio se realizó siguiendo los protocolos internacionales ⁽⁹⁾.

2.3.4.3.2. Etapa II

Se realizó entre los años 2005 y 2011 y comprendió el estudio de 56 pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO; de ellos, tres provenían de los diagnosticados antes del inicio de la investigación, seis de la pesquisa a instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual y 47 sospechados en los servicios de Genética Clínica luego del inicio de la investigación.

El análisis de los esteroides se realizó por CCF según se describió en el acápite 2.3.4.3.1.1.

2.3.5. Caracterización del fenotipo clínico en pacientes con SLO

2.3.5.1. Muestra

Estuvo conformada por 21 pacientes con diagnóstico de SLO confirmado bioquímicamente.

2.3.5.2. Procedimiento

El pilar fundamental de esta etapa de la investigación lo constituyó el método clínico. La autora y/o el genetista clínico de asistencia realizaron un examen físico minucioso por aparatos y el interrogatorio sobre la historia del embarazo, nacimiento y periodo neonatal y de la enfermedad, desarrollo sicomotor y características conductuales. Tanto en el interrogatorio como en el examen físico hubo una búsqueda intencional de manifestaciones clínicas descritas en la literatura.

Como fuentes de información complementarias se emplearon las historias clínicas individuales de la atención primaria de salud, historias clínicas genéticas, documentos sobre resultados de exámenes complementarios y evaluaciones del CDO.

Para una mejor caracterización clínica se indicó cariotipo, evaluación oftalmológica, US abdominal, TAC de cráneo y/o US transfontanelar, ecocardiografía y otros estudios específicos según los hallazgos del examen físico. En la realización de estos estudios se tuvo en consideración los beneficios a los pacientes en relación con los posibles perjuicios.

La estimación de la severidad clínica de la enfermedad se realizó según el método propuesto por Kelley y Hennekam (anexo 3) ⁽¹⁵⁾.

2.3.6. Definición de variables

- Paciente con fenotipo clínico sugestivo de SLO: se refiere a pacientes con características clínicas de SLO según los criterios considerados para esta investigación.
- Fenotipo bioquímico de SLO: se define como la presencia de valores incrementados de 7DHC por CG/EM y/o la identificación de la banda correspondiente al 7DHC por CCF.
- Paciente con SLO: se define como el paciente con fenotipo clínico y bioquímico de SLO.
- Sexo: se asignó de acuerdo con el resultado del estudio cromosómico, realizado en todos los pacientes.
- Oligoamnios: se consideró cuando por examen ultrasonográfico del segundo trimestre o posterior se informó la presencia de líquido amniótico disminuido.
- Movilidad fetal: se refiere a la percepción de la madre acerca de la movilidad fetal, puede ser disminuida, normal o aumentada.
- Diagnóstico prenatal de malformaciones congénitas por US: se refiere a la identificación de defectos estructurales de cualquier órgano o parte fetal durante el examen ultrasonográfico del segundo trimestre o posterior.

- Edad gestacional (EG) al nacimiento: número de semanas de gestación en el momento del nacimiento. Se considera pretérmino si el nacimiento ocurre antes de las 37 semanas, a término entre 37 y 42 y posttérmino a partir de las 42,1 semanas.
- Presentación: modo de presentación fetal, se clasificó en cefálica, pelviana o transversa.
- Apgar: valoración del estado neonatal basado en un puntaje realizado al minuto y a los cinco minutos, que mide la frecuencia cardíaca, la actividad respiratoria, la irritabilidad refleja, el tono muscular y el color de la piel.
- Hipoxia: se define cuando el puntaje de Apgar a los cinco minutos está por debajo de seis, si está por debajo de tres se considera hipoxia severa.
- Sepsis neonatal: se refiere a la ocurrencia de infecciones en los primeros 28 días de vida que requirieron el uso de antibióticos sistémicos.
- Peso: peso corporal expresado en kilogramos.
- Talla: longitud corporal expresada en centímetros. Se toma en posición supina al nacer y en pacientes que por su edad o patología no puedan mantenerse de pie, para los restantes pacientes se toma de pie.
- Circunferencia cefálica (CC): medida del perímetro cefálico expresada en centímetros.
- Relación peso/EG, talla/EG y CC/EG: se refiere al percentil en que se encuentran estos parámetros según las tablas cubanas ⁽¹⁷⁷⁾.
- Relación peso/edad, talla/edad y CC/edad: se refiere al percentil en que se encuentran estos parámetros según las tablas cubanas ⁽¹⁷⁸⁾.
- CIUR: se define al nacimiento cuando el peso para la EG está por debajo del tercer percentil según las tablas cubanas ⁽¹⁷⁷⁾.
- Microcefalia: CC por debajo del tercer percentil para la edad ⁽¹⁷¹⁾. La microcefalia es congénita cuando la CC al nacimiento está por debajo del tercer percentil para la EG según las tablas cubanas ⁽¹⁷⁷⁾.

- Signos dismórficos y malformaciones congénitas (referenciadas en el modelo de recolección de información): se refiere a defectos estructurales mayores o menores. Se hace un análisis partiendo del resultado del examen físico contrastado con los términos incluidos en la nomenclatura internacional ⁽¹⁷⁹⁻¹⁸⁵⁾.
- Retardo del desarrollo sicomotor: se consideró como el atraso en la adquisición de habilidades síquicas y motoras correspondientes para la edad en niños de hasta cinco años.
- Retraso mental: se clasificó en ligero, moderado o severo según la evaluación realizada al paciente por el equipo del CDO de su municipio o provincia en pacientes de más de cinco años.
- Severidad clínica: se estimó según el método de Kelley y Hennekam ⁽¹⁵⁾, se clasificó en ligera, moderada o severa cuando el valor del puntaje fue \leq a 20, entre 21 y 50 y $>$ 50, respectivamente ⁽⁵³⁾.
- Fenotipo clásico: se dice cuando se presentan las manifestaciones dismórficas típicas de la enfermedad, que generalmente se corresponde con una severidad clínica ligera y moderada.

2.3.7. Recogida de los datos

Toda la información obtenida del examen físico a los pacientes, la entrevista a los familiares, las historias clínicas previas y los exámenes complementarios indicados fue registrada en dos instrumentos, el primero para ser llenado por los especialistas a los pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO (anexo 9) y el segundo para aplicar a pacientes con diagnóstico de SLO confirmado bioquímicamente (anexo 10).

2.3.8. Análisis y procesamiento de los datos

Para facilitar el manejo de la información se implementó un fichero de datos primarios en EXCEL, que se procesó utilizando el paquete estadístico EPI-INFO 2010.

Se empleó la estadística descriptiva para analizar el comportamiento de las frecuencias de diversas manifestaciones clínicas incluidas en distintos sistemas o estructuras anatómicas, así como del intelecto y la conducta. Se incluyen aspectos epidemiológicos como la edad y el sexo, además de variables relacionadas con la historia del embarazo, el nacimiento y el periodo neonatal. También lo referente al desarrollo físico

expresado a través de parámetros biométricos como el peso, la talla y la CC, medidos tanto en el momento del nacimiento como en el de la confirmación del diagnóstico.

2.4. Resultados

2.4.1. Selección de pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO

En la tabla 1 se muestran los pacientes con diagnóstico clínico sugestivo de SLO según la vía que se utilizó para su selección.

Como se puede apreciar, se encontraron registrados en los servicios de Genética Clínica del país 15 pacientes con diagnóstico clínico de SLO antes del inicio de la investigación. Ocho de ellos habían sido diagnosticados en el servicio de Genética Clínica del Hospital Pediátrico William Soler, uno en el de Centro Habana, uno en el Juan M. Márquez, cuatro en el Centro de Genética Médica de Villa Clara y uno en el de Sancti Spíritus.

Entre las 1 224 personas con discapacidad intelectual pesquisadas en las instituciones se identificó el fenotipo sugestivo de SLO en nueve (0,73 %). En la tabla 2 se muestran los resultados de la pesquisa en dichas insituciones.

En los pacientes atendidos en los servicios de Genética Clínica del país luego de iniciada la investigación se sospechó la enfermedad en 57 pacientes procedentes de 13 provincias y el municipio especial Isla de la Juventud.

En resumen, por medio de las tres vías utilizadas, se reconocieron 81 pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO.

Tabla 1. Pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO, estudiados y confirmados bioquímicamente según vías de selección de los pacientes y etapas de la investigación

Etapas de la investigación	Vía de selección de pacientes										Total	
	Diagnóstico clínico previo a la investigación			Pesquisa en instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual			Atendidos en servicios de Genética Clínica luego del inicio de la investigación					
	Fenotipo clínico sugestivo de SLO	Estudiados bioquímicamente	Diagnósticos confirmados	Fenotipo clínico sugestivo de SLO	Estudiados bioquímicamente	Diagnósticos confirmados	Fenotipo clínico sugestivo de SLO	Estudiados bioquímicamente	Diagnósticos confirmados	Fenotipo sugestivo de SLO	Estudiados bioquímicamente	Diagnósticos confirmados
Etapa I (años 2001 - 2004)	12	8	8	3	3	1	10	10	1	25	21	10 (47,6 %)
Etapa II (años 2005 - 2011)	3	3	2	6	6	0	47	47	9	56	56	11 (19,6 %)
Total	15*	11	10 (90,9 %)	9	9	1 (11,1 %)	57	57	10 (17,5 %)	81	77	21 (27,3 %)

* Cuatro pacientes fallecidos

Tabla 2. Resultado de la pesquisa clínica del síndrome SLO en pacientes institucionalizados

Provincia	Institución	Pacientes evaluados	Pacientes con fenotipo sugestivo de SLO
	CSP Benjamín Moreno	90	2
	CSP La Edad de Oro 7	148	0
	CSP La Edad de Oro 5	116	0
	CSP Juan Ruiz Serna	48	2
La Habana	CSP 5.ª B y 42 Playa	39	0
	CSP 4.ª y 14 Playa	94	2
	CSP Paquito González Cueto	56	0
	CSP Laura Martínez	72	1
	Círculo Infantil Zunzún	44	0
	Clínica Zenén Casas	31	0
Sancti Spíritus	CSP El Reparador de sueños	98	1
	Escuela Protesta de Jarao	110	0
Villa Clara	CSP Santa Clara	98	0
Cienfuegos	CSP Cienfuegos	85	1
Ciego de Ávila	CSP Morón	22	0
Las Tunas	CSP Las Tunas	73	0
Total		1 224	9

2.4.2. Reconocimiento del fenotipo bioquímico del SLO en pacientes con fenotipo clínico sugestivo de la enfermedad

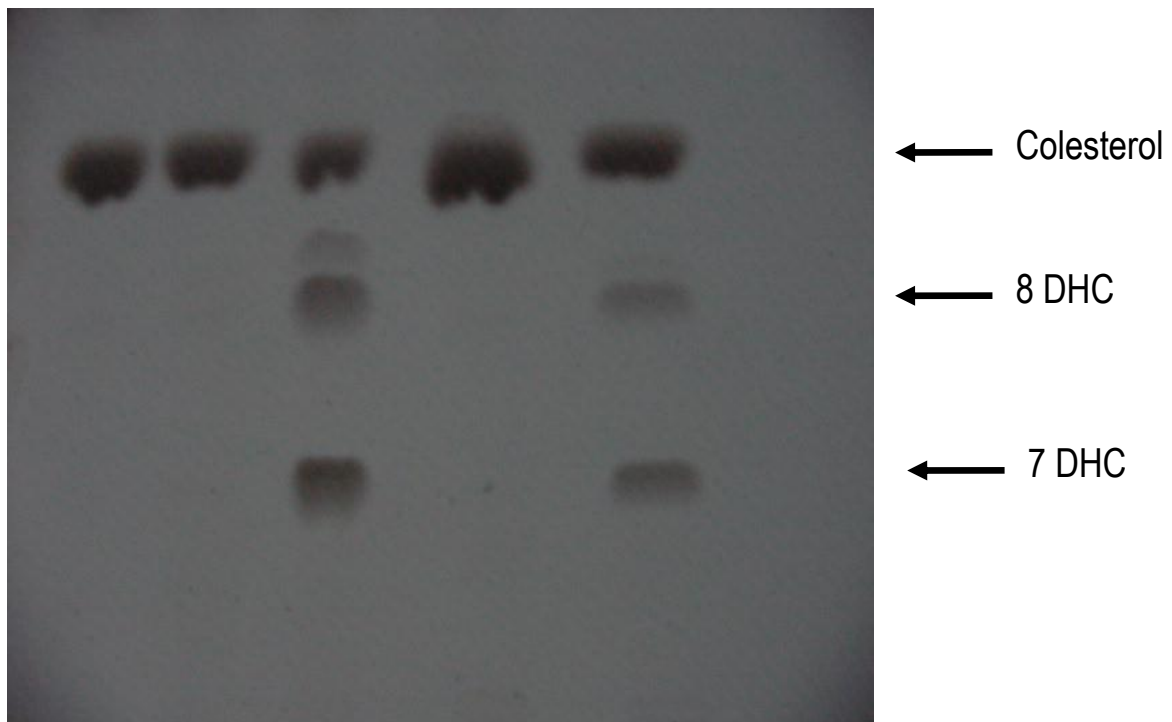
En la tabla 1 se muestran los resultados del estudio bioquímico según las vías de selección de los pacientes con fenotipo sugestivo de SLO y las etapas de la investigación. Como se puede apreciar, se realizó el estudio del fenotipo bioquímico de SLO en un total de 77 pacientes de los 81 con fenotipo clínico sugestivo, todos procedentes de distintas familias, y se confirmó el diagnóstico en 21 (27,3 %), que representa un caso positivo por cada 3,7 pacientes analizados.

La mayor concordancia clínico-bioquímica se obtuvo de la vía de pacientes con diagnóstico antes del inicio de la investigación (90,9 %), seguido de los pacientes atendidos en los servicios de Genética Clínica durante la investigación (17,5 %) y por último la pesquisa en instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual (11,1 %).

Los resultados por etapas muestran que en la primera el 47,6 % de los pacientes analizados (10 de los 21) tuvo confirmación del diagnóstico de SLO, de los cuales ocho provienen de los que tenían diagnóstico antes del inicio de la investigación. Hubo una concordancia total de los resultados entre los dos métodos empleados para el reconocimiento del fenotipo bioquímico (CCF y CG/EM). Los valores de 7DHC y colesterol en este grupo de pacientes estuvieron en el rango de 219 a 599 $\mu\text{mol/L}$ y 1 160 a 2 830 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (anexo 11).

La figura 1 muestra el estudio por CCF.

En la segunda etapa se analizaron bioquímicamente 56 pacientes y se confirmó el diagnóstico en 11 (19,6 %), de ellos nueve proceden de la vía de pacientes atendidos en los servicios de Genética Clínica durante la investigación y los dos restantes de los que tenían diagnóstico antes del inicio de la misma.



1 2 3 (-) (+)

1. Paciente negativo (sin SLO)

2. Paciente negativo (sin SLO)

3. Paciente positivo (afectado por SLO)

(-) Patrón negativo

(+) Patrón positivo

Figura 1. Resultado del estudio de esteroides por CCF en 3 pacientes

2.4.3. Caracterización del fenotipo clínico de pacientes con SLO

2.4.3.1. Características generales

En los 21 pacientes la edad al diagnóstico bioquímico osciló entre el periodo neonatal y los 34 años, con un promedio de nueve años. De los ocho pacientes diagnosticados por encima de esa edad promedio, cinco tenían diagnóstico clínico antes de la investigación. Del total, 15 son varones (71 %) y seis son hembras (29 %). En el anexo 11 se muestra una caracterización general de los pacientes.

2.4.3.2. Historia del embarazo, nacimiento y periodo neonatal

De los 15 pacientes de los que se obtuvo información prenatal, tres (21 %) se refirió amenaza de aborto y en igual número disminución de movimientos fetales, mientras que en 4 (26,8 %) hubo oligoamnios.

En ningún caso se diagnosticó prenatalmente malformaciones congénitas, a pesar de encontrarse con posterioridad cardiopatías potencialmente detectables en la vida fetal, como son el CAV completo, la tetralogía de Fallot y la CoA.

El 90 % nació a término y el 36,8 % en presentación pelviana. En solo 10 pacientes se conoció el conteo de Apgar que en todos fue normal.

La hipotonía neonatal ocurrió en el 95 % de los casos. Las dificultades en la alimentación, caracterizadas por pobre succión, desinterés por los alimentos, vómitos y reflujos, se presentaron en 14 pacientes (66,6 %), de los cuales 11 (78,5 %) necesitaron alimentación por gavage. Cinco pacientes (23,8 %) tuvieron infecciones neonatales (uno sepsis urinaria y cuatro neumonía y sepsis generalizada).

2.4.3.3. Desarrollo físico

El peso promedio al nacimiento de los 20 pacientes de los que se obtuvo esta información fue de 2,5 kg y para los nacidos a término fue de 2,7 kg. De esos 20 pacientes, dos (10 %) clasificaron como CIUR y 17 de los 18 restantes tuvieron un peso entre los percentiles 3 y 50 para la EG. En la tabla 3 se muestra comparativamente el peso al nacimiento y a la edad en la que se realizó la confirmación diagnóstica, que denota una declinación estadísticamente significativa.

Tabla 3. Datos comparativos entre el peso al nacimiento y a la edad en que se confirmó el diagnóstico en 20 pacientes cubanos con SLO

Percentil	Peso al nacer según edad gestacional		Peso al momento de la confirmación diagnóstica	
	Número de pacientes	%	Número de pacientes	%
Menos de 3	2	10	14	70
Entre [3 y 10]	4	20	4	20
Entre (10 y 25]	7	35	1	5
Entre (25 y 50]	6	30	1	5
Entre (50 y 75]	1	5		

Test de rangos con signos de Wilcoxon ($Z=-3,92$; $p= 0,00$)

La talla al nacimiento se conoció en 13 pacientes y en todos fue normal para la EG, pero estuvo en la media poblacional o por debajo en el 69,3 % de los pacientes. Se produjo una declinación del crecimiento, significativa estadísticamente, en relación con el momento en que se realizó el diagnóstico bioquímico (tabla 4).

En tres de los 13 pacientes (23,1 %) de los que se dispuso el dato de la CC al nacimiento era evidente la microcefalia, mientras que en los 10 restantes la CC osciló entre los percentiles 3 y 50 para la EG (la mitad de ellos entre los percentiles 3 y 10). También se observó una declinación estadísticamente significativa de este parámetro en relación con el momento en que se realizó el diagnóstico bioquímico (tabla 5). En 19 pacientes (90,4 %) la microcefalia se acompañó de estrechamiento bitemporal.

2.4.3.4. Características craneofaciales

Además de la microcefalia y el estrechamiento bitemporal, los dismorfismos craneofaciales más comunes (presentes en más del 40 % de los pacientes) son: micrognatia, ptosis palbebral, estrabismo, nariz de puente deprimido, punta ancha y narinas en anteversión, rugosidad de los arcos alveolares y/o paladar, alteraciones en la erupción dentaria, paladar alto y estrecho, malposición y maloclusión dentaria, hipercrecimiento de los arcos alveolares y orejas de implantación baja y/o rotación posterior (tabla 6). El conjunto de estos rasgos dismórficos dan a la cara un aspecto distintivo, aunque a veces son muy sutiles como en el paciente n.º 14 (figura 2). En la adultez persisten estos dismorfismos faciales (figura 3).

La paciente n.º 10 (figura 4) tiene un incisivo central único, que es una manifestación mínima de HPE.

2.4.3.5. Sistema osteomioarticular (SOMA)

Las anomalías del SOMA se muestran en la tabla 7.

Como se puede apreciar, en las manos lo más significativo es el acortamiento/implantación proximal del pulgar. La braquidactilia ocurre comúnmente en los dedos 1, 2 y 3, y de manera notable en el 2.º. La braquidactilia del 3.º dedo le proporciona una longitud similar al 4.º dedo (figura 5). La clinodactilia del 5.º dedo es la más común y en todos los casos el encorvamiento tuvo sentido radial, sin embargo la clinodactilia también afecta a otros dedos, tanto con desviación radial como ulnar.

Tabla 4. Datos comparativos entre la talla al nacimiento y a la edad en que se confirmó el diagnóstico en 13 pacientes cubanos con SLO

Percentil	Talla al nacer según edad gestacional		Talla al momento de la confirmación diagnóstica	
	Número de pacientes	%	Número de pacientes	%
Menos de 3	0	0	9	69,2
Entre [3 y 10]	1	7,7	2	15,4
Entre (10 y 25]	3	23,1	1	7,7
Entre (25 y 50]	5	38,4	1	7,7
Entre (50 y 75]	2	15,4		
Entre (75 y 90]	1	7,7		
Entre (90 y 97]	1	7,7		

Test de rangos con signos de Wilcoxon ($Z=-3,81$; $p=0,001$)

Tabla 5. Datos comparativos entre la circunferencia cefálica al nacimiento y a la edad en que se confirmó el diagnóstico en 13 pacientes cubanos con SLO

Percentil	Circunferencia cefálica al nacer según edad gestacional		Circunferencia cefálica al momento de la confirmación diagnóstica	
	Número de pacientes	%	Número de pacientes	%
Menos de 3	3	23,1	11	84,6
Entre [3 y 10]	5	38,4	1	7,7
Entre (10 y 25]	4	30,8	1	7,7
Entre (25 y 50]	1	7,7		

Test de rangos con signos de Wilcoxon ($Z=-3,06$; $p= 0,002$)

Tabla 6. Características craneofaciales en 21 pacientes con SLO

Característica fenotípica	Número de pacientes	%
Craneofacial general		
Estrechamiento bitemporal	19	90,4
Micrognatia	19	90,4
Metópica prominente	4	19
Occipucio plano	4	19
Filtrum largo	4	19
Occipucio prominente	1	4,7
Ojos		
Ptosis palpebral	17	80,9
Estrabismo	11	52,3
Cataratas	3	14,2
Desviación hacia arriba de las fisuras palpebrales	3	14,2
Fisuras palpebrales estrechas	1	4,7
Microftalmía	1	4,7
Nariz		
Narinas en anteversión	20	95,2
Punta nasal ancha	19	90,4
Puente nasal deprimido	18	85,7
Boca		
Rugosidad de arcos alveolares y/o paladar	12	57,1
Alteraciones de la erupción dentaria (erupción prematura, alteraciones de la cronología y erupción de los definitivos antes de caída de los deciduos)	11	52,3
Paladar alto y estrecho	10	47,6
Malposición y/o maloclusión dentaria	9	42,8
Hipercrecimiento de arcos alveolares	9	42,8
Paladar blando hendido	8	38
Boca grande	7	33,3
Hendidura submucosa del paladar	2	9,5
Hipercrecimiento del tejido sublingual	2	9,5
Hipodontia	2	9,5
Microglosia	1	4,7
Alteraciones del esmalte	1	4,7
Orejas		
Grandes	18	85,7
Bajas y/o rotación posterior	17	80,9



Paciente n.º 2



Paciente n.º 14

Figura 2. Características craneofaciales en el SLO, el paciente n.º 2 tiene una dismorfia facial clásica con microcefalia y notable estrechamiento bitemporal, mientras que en el paciente n.º 14 la dismorfia facial es ligera (fotografías presentadas con el consentimiento de los padres)

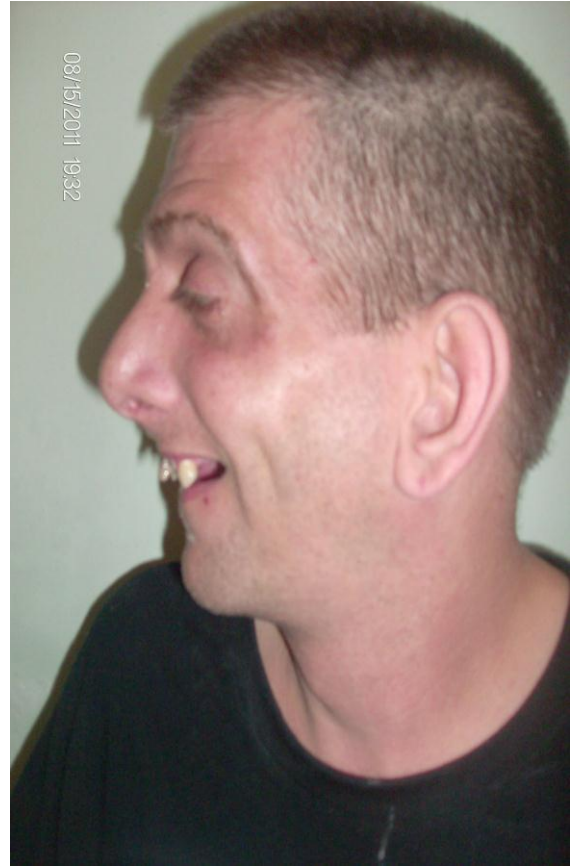


Figura 3. Paciente n.º 8 a los 13 meses y a los 35 años de edad, se puede observar cómo persisten las características faciales típicas del SLO (fotografías presentadas con el consentimiento de los padres)



Figura 4. Incisivo central único en la paciente n.º 10, también se puede observar el paladar profundo y rugoso

Tabla 7. Anomalías del sistema osteomioarticular en 21 pacientes con SLO

Característica fenotípica	Número de pacientes	%
Manos		
Acortamiento/implantación proximal del pulgar	14	66,6
Braquidactilia de uno o más dedos	11	52,3
Clinodactilia	11	52,3
Pliegue palmar transversal único	10	47,6
Aumento de pliegues interfalángicos	9	42,8
Desviación ulnar de los dedos	7	33,3
Hipoplasia tenar	7	33,3
Hiperlaxitud interfalángica	6	28,5
Polidactilia postaxial	5	23,8
Superposición de dedos	5	23,8
Retención de almohadillas digitales	3	14,2
Pies		
Sindactilia 2-3	21	100
Deformidad en valgo	11	52,3
Braqui y clinodactilia del 5to dedo	9	42,8
Pies planos	4	19
Superposición de los dedos	3	14,2
Flexión plantar del 1er dedo	2	9,5
Polidactilia postaxial	2	9,5
Hallux valgus	2	9,5
Deformidad en varo	1	4,7
Otras		
Escoliosis	9	42,8
Subluxación de cadera	2	9,5
Pectus excavatum	2	9,5



Paciente n.º 8



Paciente n.º 10

Figura 5. Anomalías de las manos en el SLO, en el paciente n.º 8 se puede apreciar el acortamiento e implantación proximal del pulgar y la braquidactilia del 2.^{do} y 3.^{er} dedos, que es más notable en el 2.^{do} y en el paciente n.º 10 se evidencia la superposición de los dedos de las manos al cerrarlas

En los pies la totalidad de los pacientes mostraron sindactilia membranosa entre los dedos dos y tres. Con excepción de un paciente, en los demás es bilateral pero generalmente asimétrica. Dos pacientes tienen sindactilia mínima que compromete solo a las falanges proximales y otros dos una fusión total de los dedos, mientras los restantes tienen sindactilias parciales con o sin la típica forma de Y (figura 6).

No se observó relación entre el tipo de sindactilia y la severidad de la enfermedad. Por ejemplo, los pacientes n.º 8 y n.º 11, con fenotipo típico pero ligero según el puntaje de severidad clínica, tienen sindactilia mínima, mientras que el paciente n.º 14, también con fenotipo ligero de acuerdo con el mismo puntaje pero con mínima dismorfia, desarrollo pondoestatural y cefálico normales y escasos trastornos conductuales, tiene una sindactilia 2-3 total.

2.4.3.6. Genitales

Una amplia gama de malformaciones genitales está presente en 13 de los 15 varones (86,6 %) (tabla 8), entre las que predominan la hipospadia y la criptorquidia. En nueve pacientes coexisten dos o más anomalías; tres pacientes tienen genitales ambiguos (figura 7), una condición que representa una urgencia médica relativa por su repercusión familiar y social. Cuatro de las seis hembras tienen hipoplasia de labios mayores y/o menores y una hipertrofia del clítoris.

2.4.3.7. Órganos internos

En siete pacientes (33,3 %) se diagnosticaron malformaciones de órganos internos, tres de los cuales tienen más de una anomalía.

Como se puede apreciar en la tabla 9, la frecuencia de malformaciones en los sistemas cardiovascular y urinario es del 19 % en cada uno y en el digestivo de 14,3 %.

Las malformaciones cardiovasculares encontradas fueron: CAV completo, PCA, CoA, tetralogía de Fallot y obstrucción de venas pulmonares derechas, cada una presente en un paciente.

La malformación digestiva más frecuente, que se manifiesta en tres pacientes (14,3 %), es la estenosis hipertrófica del píloro. Además de los defectos estructurales, los trastornos de la motilidad del tubo digestivo que son causantes de vómitos, constipación y diarreas especialmente en el primer año de vida se observaron en el 48 % de los enfermos.



Paciente n.º 11



Paciente n.º 14



Paciente n.º 10

Figura 6. Variantes de sindactilia 2-3 en el SLO, en el paciente n.º 11 sindactilia mínima, en el n.º 14 sindactilia total y en el n.º 10 sindactilia en forma de Y (típica); también puede observarse la flexión plantar del primer dedo y el hallux valgus

Tabla 8. Tipos de anomalías genitales en 13 varones con SLO

Tipo de anomalía	Frecuencia	
	Número de pacientes	%
Hipospadia	7	53,8
Criptorquidia	6	46,1
Pene pequeño	3	23,1
Encorvamiento del pene	1	7,7
Escrotos bífidos	2	15,4
Escrotos pequeños	1	7,7
Prepucio redundante	2	15,4
Genitales ambiguos	3	23,1



Paciente n.º 15



Paciente n.º 20

Figura 7. Genitales ambiguos en los pacientes n.ºs 15 y 20, se observa también el engrosamiento de la rafia anoescrotal en el paciente n.º 15

Tabla 9. Malformaciones de órganos internos en 21 pacientes cubanos con SLO

Malformaciones por sistemas	Total de pacientes afectados		Malformaciones observadas	
	Número	%	Tipo	Número
Cardiovascular	4	19	Canal aurículoventricular completo	1
			Persistencia del conducto arterioso	1
			Coartación de la aorta	1
			Tetralogía de Fallot	1
			Obstrucción de venas pulmonares derechas	1
Digestivo	3	14,3	Estenosis hipertrófica del píloro	3
			Microgastria	1
Urinario	4	19	Agenesia/hipoplasia renal unilateral	2
			Ectopia renal	1
			Reflujo vésico-ureteral	1
			Estrechez uretral	1

Dos pacientes (9,5 %) tienen hipoplasia/agenesia renal, mientras que la ectopia renal, el reflujo vésico-ureteral y la estrechez uretral, se presenta cada una en un caso.

Solamente en nueve pacientes se realizaron estudios por imágenes del SNC (cuatro TAC y cinco US transfontanelar). En ninguno de ellos se diagnosticaron malformaciones. A la paciente que presenta un incisivo central único, una manifestación mínima de HPE, tampoco se le pudieron realizar estos exámenes del SNC.

2.4.3.8. Desarrollo sicomotor y fenotipo conductual

En la tabla 10 se muestran las principales características intelectuales y de la conducta observadas en 20 de los pacientes estudiados.

El retardo del desarrollo sicomotor o retraso mental está presente en la totalidad de los casos. De los 18 enfermos mayores de cinco años, 14 (77,7 %) tienen retraso mental severo y los restantes retraso moderado. Todos los pacientes menores de 5 años tienen retardo del desarrollo sicomotor.

Los trastornos del desarrollo del lenguaje están presentes en todos los pacientes de dos años o más. Tres pacientes no pronuncian ninguna palabra y 15 dicen menos de 10, de esos solo dos hacen oraciones de dos palabras. Los restantes tres pacientes tienen un lenguaje de alrededor de 50 palabras y hacen oraciones de tres o cuatro palabras. Se observan más dificultades en la emisión del lenguaje que en la recepción.

Las alteraciones conductuales están presentes en el 90 % de los casos, aunque son variables en cuanto a tipo y severidad.

Una de las manifestaciones más frecuentes (70 %) es la hipersensibilidad táctil, que es más pronunciada en las manos y los pies y ocasiona que a los pacientes no les gusta que los toquen y no caminen descalzos. También puede ser oral y originar el rechazo a los alimentos sólidos observado en varios enfermos. Además se refirió hipersensibilidad a la luz y a los ruidos, situación que mejoró con la edad en todos los pacientes.

Tabla 10. Características intelectuales y conductuales en 20 pacientes con SLO

Característica fenotípica	Número de pacientes	%
Retraso del desarrollo sicomotor/retraso mental	20	100
Dificultades en el desarrollo del lenguaje *	18	100
Hipersensibilidad táctil	14	70
Autolesión	11	55
Conductas ritualistas	9	45
Trastornos del sueño	8	40
Agresividad	5	25
Hiperquinesia	5	25
Hipersensibilidad a los ruidos	5	25
Crisis de irritabilidad	5	25
Opistosquinesis	4	20
Hipersensibilidad a la luz	3	15

* Para esta característica fueron evaluados 18 pacientes

El 55 % de los casos se autolesionan, las formas más usuales de autoinfligirse daños son los golpes en la cabeza con las paredes u otros objetos o con las propias manos, así como las mordeduras en las muñecas.

Se encontraron varias conductas ritualistas, la más común, vista en el 45 % de los pacientes, es la fijación con objetos como un juguete, anillos, pomos, revistas, espejuelos, que mantienen en sus manos durante horas y se irritan si se les quita (figura 8). Otras conductas ritualistas son el balanceo del cuerpo y la observación reiterada del mismo programa de televisión o de objetos giratorios.

En ocho enfermos (40 %) se refirieron trastornos del sueño, caracterizados fundamentalmente por dormir poco de noche a pesar de no dormir durante el día, a menudo asociado a crisis de llanto, situación que fue mejorando con la edad en cinco pacientes.

Otras alteraciones de la conducta encontradas fueron la agresividad (referida como un comportamiento presente o pasado en el 25 % de los pacientes, tanto en niños como adultos), la hiperquinesia, la irritabilidad y los movimientos de opistosquinesis.

2.4.3.9. Otras características clínicas

Otras anomalías encontradas son: engrosamiento de la rafia anoescrotal en ocho de los 15 varones (53,3 %), hoyuelo sacro profundo (20 %), hiperhidrosis de las manos y/o pies (30 %), cutis marmorata y acrocianosis, que aparecen con frecuencia de 25 y 10 % respectivamente y que tienden a desaparecer con la edad.

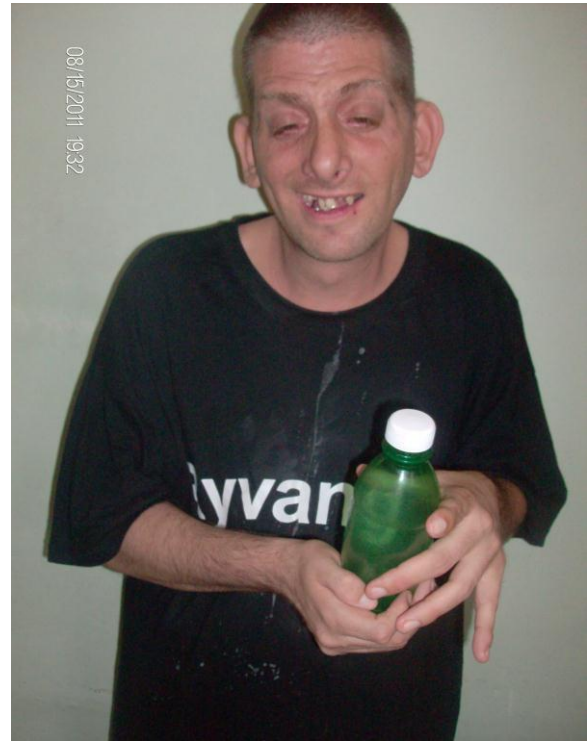
La fotosensibilidad fue referida en cuatro pacientes. Se caracteriza por enrojecimiento en áreas de la piel directamente expuestas al sol, a veces asociada a prurito, que puede aparecer apenas minutos después del inicio de la exposición y durar varias horas, sin dejar huellas en la piel luego de su desaparición.

2.4.3.10. Severidad clínica de la enfermedad

El puntaje de severidad clínica según Kelley y Hennekam ⁽¹⁵⁾ osciló entre 10 y 20 en 16 pacientes y entre 22 y 35 en los restantes, por lo que predominan los fenotipos ligeros sobre los moderados (anexo 11).



Paciente n.º 6



Paciente n.º 8

Figura 8. Conductas ritualistas en el SLO, se puede observar cómo los pacientes mantienen objetos en las manos; en el paciente n.º 6 se puede percibir también la hiperlaxitud interfalángica

2.5. Discusión

2.5.1. Selección de pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO

Como resultado de las acciones capacitantes se incrementó el número de pacientes en los que se reconoció un fenotipo sugestivo de SLO, que es seis veces superior a los identificados en los 37 años comprendidos entre la primera descripción de la enfermedad y el inicio del presente estudio. Dentro de este grupo de pacientes se incluyen algunos evaluados previamente por genetistas clínicos u otros especialistas, que no tenían planteado un diagnóstico clínico, y que fueron sospechados a partir de la capacitación realizada como parte de esta investigación.

Todos los pacientes que antes del inicio de la investigación tenían la impresión diagnóstica de SLO fueron incluidos en el estudio bajo el supuesto de que la misma había sido planteada teniendo en cuenta las características clínicas típicas descritas en la literatura.

La pesquisa en instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual permitió la evaluación de un número amplio de potenciales pacientes de SLO en un tiempo relativamente corto. Con ese mismo propósito se seleccionó la sindactilia 2-3 de los pies, de conjunto con el retraso mental, como criterios iniciales en la pesquisa. La sindactilia 2-3 de los pies no es patognomónica del SLO pero está descrita en alrededor del 95 % de los enfermos (incluso aquellos con dismorfismos ligeros) ⁽¹⁵⁾ y es un signo de fácil identificación, que permitió una primera selección de casos sospechosos a los cuales se les realizó una evaluación clínica más exhaustiva en busca de otras características comunes en la enfermedad e incluidas dentro de los criterios diagnósticos de esta investigación. No obstante, la utilización de la sindactilia 2-3 de los pies como criterio inicial de búsqueda implica un subdiagnóstico del 5 %. La pesquisa en instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual no pudo realizarse en todas las provincias por razones logísticas.

Los criterios de sospecha clínica establecidos para los pacientes evaluados en consultas de Genética Clínica no tuvieron en consideración como signo ineludible la sindactilia 2-3 de los pies para evitar el

subdiagnóstico que ello representa y se adecuaron a la edad en atención a las variaciones en la frecuencia de las manifestaciones clínicas relacionadas con la misma ^(15,48).

2.5.2. Reconocimiento del fenotipo bioquímico del SLO en pacientes con fenotipo clínico sugestivo de la enfermedad

La correlación clínico-bioquímica en este estudio (un caso positivo por cada 3,7 pacientes analizados) fue superior a la reportada por otros, que es de un diagnóstico por cada 6 a 114 pacientes estudiados ^(59,76,99,102,112,186,187). Los resultados más cercanos a los de la presente investigación corresponden a Cunniff y cols. ⁽⁵⁹⁾, que diagnosticaron caso por cada 6,2 pacientes estudiados, la mayor parte de los cuales tenía diagnóstico clínico previo al conocimiento del defecto bioquímico causante de la enfermedad, por esta razón pudo haber analizado a pacientes con fenotipo clásico. Esta debe ser también la explicación para el comportamiento de los resultados en los pacientes cubanos, en los que la mayor proporción de casos positivos provino de los que tenían diagnóstico antes de la investigación.

Los estudios más recientes ^(76,99,187) incluyen pacientes con fenotipo menos clásico con el propósito de “descartar SLO”, considerando el ensanchamiento del espectro fenotípico derivado del descubrimiento de un marcador bioquímico. Bajo ese mismo principio se seleccionaron los criterios para identificar fenotipos sugestivos de SLO tanto en la pesquisa a instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual como en las consultas de Genética Clínica. Los signos clínicos que se propusieron son los más frecuentemente referidos en la literatura, pero ninguno es patognomónico ^(8,188), por lo que su combinación ofrece la posibilidad de diagnosticar pacientes en ambos extremos del fenotipo pero también la inclusión de otros con enfermedades diferentes al SLO, con las que existe solapamiento clínico. Por ejemplo, la sindactilia 2-3 de los pies, que es el defecto estructural más frecuente en el SLO ^(15,48,50,51,53,54,59,82) también puede estar presente en otros 130 síndromes genéticos ⁽¹⁸⁹⁾.

En los 10 pacientes estudiados por CG/EM, los niveles de 7DHC y colesterol están en el rango de valores de los enfermos de diferentes series publicadas. En el capítulo 4 se hace una evaluación más detallada de estos aspectos.

2.5.3. Caracterización del fenotipo clínico de pacientes con SLO

2.5.3.1. Características generales

La distribución por sexos no es la esperada de acuerdo al modo de herencia del SLO pero se corresponde con lo reportado internacionalmente y se le atribuye a la presencia de las malformaciones genitales que favorecen el diagnóstico en los varones. Un análisis más detallado de este aspecto se hace en el capítulo 3

2.5.3.2. Historia del embarazo, nacimiento y periodo neonatal

La amenaza de aborto, la disminución de los movimientos fetales y el oligoamnios han sido referidos también por otros autores ^(49,51,54).

De igual modo el nacimiento a término y la presentación pelviana se describen como habituales ^(15,190) y no se encontraron referencias de un mayor riesgo de hipoxia en recién nacidos con SLO.

En relación con la hipotonía, presente en el 95 % de los enfermos cubanos, revisiones de la literatura la han referido como un hallazgo casi universal durante la infancia temprana. Se plantea que su origen es en parte central pero está también influida por la hipoplasia muscular congénita. Por su frecuencia este signo es de gran importancia en el diagnóstico de la enfermedad durante esa etapa de la vida ^(15,48), razón por la cual fue incluida entre los signos de sospecha para recién nacidos y lactantes en esta investigación.

Los trastornos en la alimentación presentes en los pacientes de este estudio coinciden con lo referido por otros autores, quienes los consideran como características muy comunes de la enfermedad, especialmente en los pacientes con los fenotipos más severos ^(15,16). Un estudio reciente encontró una relación estadísticamente significativa entre los trastornos de la alimentación con la disminución del colesterol y en especial con el incremento del 7DHC ⁽⁵²⁾.

También los procesos sépticos se describen como frecuentes en los pacientes con SLO durante la infancia, sin embargo, no se ha logrado identificar un trastorno inmunológico primario que explique este comportamiento ^(4,15,190).

2.5.3.3. Desarrollo físico

El peso promedio de los recién nacidos a término con SLO es sensiblemente inferior a los de la población general cubana, que oscila entre 3,3 y 3,4 kg ⁽¹⁷⁷⁾. En el anexo 12 se muestra cómo en las diferentes series de pacientes publicadas la ganancia insuficiente de peso postnatal es más común que el CIUR, aunque en ellas también predomina el peso al nacimiento por debajo del 50 percentil para la EG. ^(49,54).

También está descrito que tanto los niños como los adultos con SLO tienen una estatura promedio por debajo de la media poblacional ⁽¹⁶⁾, del mismo modo que se manifestó en los pacientes de esta investigación.

El comportamiento del peso y de la talla denota que el retardo pondoestatural comienza realmente en la vida fetal, tiene un origen intrínseco, aunque se haga más manifiesto después del nacimiento, empeorado además por los trastornos de la alimentación que se presentan comúnmente ^(15,48,50,51,54,55,85,190).

La microcefalia ocurre en alrededor del 85 % de los pacientes reportados en la literatura (anexo 12) pero en algunas series predomina la microcefalia congénita ^(50,190) y en otras, como en esta, el inicio postnatal temprano, con medidas de la CC al nacimiento frecuentemente entre los percentiles 3 y 10 para la EG ^(49,54). La microcefalia generalmente no es muy llamativa porque está en proporción con las dimensiones corporales, excepto en algunos casos con una CC extremadamente pequeña. A diferencia de la microcefalia vera o de la que forma parte de algunos síndromes genéticos, no se aprecia la frente inclinada, pero sí el estrechamiento bitemporal, encontrado también en otros pacientes referidos en las publicaciones ^(49,50,190).

Un estudio antropométrico longitudinal realizado en 78 pacientes con SLO de ambos sexos mostró que las curvas de peso, talla y CC estaban por debajo de las dos desviaciones estándar respecto a las de personas sanas de la misma población. No se encontraron en la literatura resultados de investigaciones sobre las causas del retardo del desarrollo físico en el SLO, aunque sí existen elementos provenientes de estudios en animales que sugieren la participación de los derivados oxidados del 7DHC ⁽²⁾.

2.5.3.4. Características craneofaciales

Con excepción del incisivo central único presente en un enfermo, las características craneofaciales encontradas en esta investigación son típicas del SLO ^(3,15,48), aunque sutiles en el paciente n.º 14. La evaluación de la cara es especialmente útil en el diagnóstico de los síndromes dismórficos. En el caso específico del SLO los dismorfismos faciales en ocasiones son muy ligeros ^(54,63,79,84,110) o están distorsionados por concomitar con la secuencia de HPE o de Potter ⁽¹⁹¹⁻¹⁹³⁾, por lo que se hace muy necesaria la adecuada valoración de otros signos clínicos frecuentes para lograr un diagnóstico certero.

Algunos investigadores han observado una atenuación de la dismorfia facial con la edad ^(18,51,190,194), no obstante se mantienen características clínicas típicas como se observa en el paciente cubano que se muestra en la figura 3.

En los acápites 4.4.3.1.1 y 4.5.3.1.1 se hace una presentación y discusión más exhaustiva del paciente con el incisivo central único.

2.5.3.5. Sistema osteomioarticular (SOMA)

Todas las anomalías del SOMA encontradas han sido referidas con anterioridad en otras series de pacientes ^(15,48,50,51). La sindactilia 2-3 de los pies es el defecto estructural más comúnmente reportado y por tanto de gran importancia para el diagnóstico (anexo 12), pues se observa incluso en los pacientes con las formas más leves de la enfermedad (anexo 13). Aunque típicamente es membranosa parcial en forma de Y, también puede ser total, parcial (sin la forma de Y) o muy ligera, de la misma manera en que puede expresarse la sindactilia 2-3 aislada de herencia autosómica dominante (McKusick n.º 609815) ⁽¹⁾, conocida también como sindactilia I-a según la clasificación de Malik y cols. ⁽¹²⁶⁾, que por su frecuencia es considerada una variante normal.

Según la experiencia de la autora de este trabajo, la sindactilia 2-3 es subvalorada por los genetistas clínicos y a pesar de ser un signo presente en 130 síndromes genéticos ⁽¹⁸⁹⁾, como se dijo previamente, debe hacer pensar en el SLO como las manchas café con leche en la neurofibromatosis. Otros autores tienen criterios similares ^(4,63); 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 la sindactilia 2-3 de los pies en conjunto con otras alteraciones fenotípicas.

2.5.3.6. Genitales

Hay similitud en los resultados de este estudio con lo reportado en la literatura ^(15,50,51,53,54,82), excepto en que entre los pacientes cubanos ninguno tiene sexo reverso. La identificación de las malformaciones genitales en los varones es de gran valor en el diagnóstico del SLO (especialmente en etapas tempranas de la vida donde la evaluación de otros signos dismórficos es más difícil) y se ha invocado como el motivo por el cual la enfermedad se diagnostica más en el sexo masculino ⁽¹⁶⁾. De especial interés resulta la ocurrencia de genitales ambiguos, por lo que el SLO es uno de los diagnósticos a considerar cuando se encuentra en niños de sexo cromosómico masculino ^(131,132).

La hipoplasia de labios mayores y/o menores y la hipertrofia del clítoris son alteraciones descritas en las hembras ⁽¹⁵⁾.

2.5.3.7. Órganos internos

El CAV completo, la PCA y la CoA que son las malformaciones cardiovasculares encontradas en los pacientes cubanos, se incluyen dentro de las más reportadas (anexo 14), aunque prácticamente todas las cardiopatías conocidas han sido descritas en el SLO ^(48,50,51,53,54,195).

Al igual que en los pacientes cubanos, la estenosis hipertrófica del píloro es la malformación digestiva que más se refiere en otras series de pacientes (anexo 14) y también hay similitud en relación a los trastornos de la motilidad del tubo digestivo ^(5,16,51,52,190).

En los pacientes cubanos tanto las malformaciones cardiovasculares como las digestivas están por debajo de lo reportado internacionalmente (anexo 14), lo que pudiera obedecer a que otras series de pacientes incluyen enfermos con fenotipo severo e incluso fetos diagnosticados prenatalmente.

La agenesia/hipoplasia renal unilateral es la más común de las anomalías renales en esta investigación y en otras publicadas ^(15,50,51,53,54), mientras que el reflujo vésico-ureteral y la estrechez uretral, aunque raras,

han sido reportadas con anterioridad (49,190,196,197). La frecuencia general de anomalías urinarias (19 %) se aproxima a las reportadas por Krakowiak y cols. y Ciara y cols. con 23 y 24 % respectivamente (53,54), aunque en otras investigaciones se han encontrado frecuencias mayores (anexo 14) (15,50,51).

En ningún paciente cubano se conoce la existencia de malformaciones del SNC, pero la baja cobertura de los estudios por imágenes de este sistema no permite comparar los resultados. Las anomalías del SNC se reportan entre el 16 y el 48 % de los enfermos publicados (anexo 14). En relación con la HPE, aparece solamente en el 5 % de los pacientes con SLO (48).

2.5.3.8. Desarrollo sicomotor y fenotipo conductual

Como puede apreciarse en el anexo 12, el retraso mental ocurre en más del 95 % de los pacientes publicados internacionalmente y aunque las formas moderadas y severas son las predominantes, también se conocen casos con retraso mental ligero e incluso con inteligencia normal baja (2,48,84,198,199), aspecto que debe tenerse en cuenta para la sospecha clínica de la enfermedad.

Las dificultades del lenguaje, fundamentalmente de la emisión, se describen como manifestaciones clínicas distintivas del SLO (5,7,48,50,199,2003).

Diversos estudios revelan que las alteraciones de la conducta son múltiples y frecuentes y que se presentan incluso en pacientes con fenotipo clínico muy ligero (54,61,63,66,79,110,188,199,201). La hiperreactividad sensorial ha sido referida por varios autores (15,18,51,202). Diversos estudios han evidenciado frecuencias elevadas, aunque variables (35-89 %), de la autolesión en pacientes con SLO (51,61,66,199,200,202). Conductas ritualistas similares a las de los pacientes cubanos han sido descritas con anterioridad (18,51,199,200,202).

Un patrón anormal del sueño semejante encontró Ryan y cols. en el 70 % de sus 49 pacientes británicos (51). Investigaciones sobre la prevalencia de problemas del sueño revelan, entre otras situaciones, las dificultades para quedarse dormidos, el despertar frecuente, temprano y/o llorando y el sueño intranquilo. Se plantea que las dificultades del sueño en pacientes con SLO pueden contribuir a la elevada frecuencia de irritabilidad y otros trastornos conductuales característicos (203,204).

La frecuencia de la agresividad en los pacientes cubanos (25 %) es más baja que la reportada en las investigaciones encabezadas por Ryan y Tierney que fue de 52 y 63 %, respectivamente ^(51,200) y en cuanto a las edades de presentación se asemeja a lo observado por Ryan y Pauli ^(51,194).

La hiperquinesia es una manifestación que ha sido observada por otros investigadores incluso en pacientes con formas muy ligeras de la enfermedad ^(63,195).

En una revisión de 164 casos realizada por Kelley y Hennekam ⁽¹⁵⁾ se refirieron como habituales las crisis de llanto inconsolable durante horas. La irritabilidad puede manifestarse además por baja tolerancia a las frustraciones, cambios de humor, impaciencia e hipersensibilidad a la estimulación ⁽⁶¹⁾, comportamientos también presentes en los enfermos analizados en esta investigación.

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 y su fisiopatología ^(64,65,200,202,205,206). Sin embargo, el SLO es una causa poco frecuente de autismo, por lo que se sugiere un examen físico detallado por parte de un genetista clínico a los pacientes autistas y no el estudio de esteroides a la totalidad de ellos ⁽²⁰⁷⁻²⁰⁹⁾.

2.5.3.9. Otras características clínicas

Dentro de los efectos pleiotrópicos de las mutaciones en el gen DHCR7 se han reportado con anterioridad el engrosamiento de la rafia anoescrotal en los varones, el hoyuelo sacro profundo, la hiperhidrosis de las manos y/o pies, la acrocianosis y el cutis marmorata ⁽¹⁵⁾. La fotosensibilidad es una característica que no se refiere en muchos trabajos, mientras que en otros se reporta en el 50 a 70 % de los enfermos ^(16,210).

2.5.3.10. Severidad clínica de la enfermedad

El puntaje de Kelley y Hennekam ha sido utilizado por alrededor de 15 años como un medidor de la gravedad del fenotipo clínico del SLO, pero se basa fundamentalmente en aspectos anatómicos, más directamente relacionados con defectos mayores de la embriogénesis. La baja frecuencia de

malformaciones de órganos internos en los pacientes cubanos contribuye a que el valor del puntaje de severidad se corresponda con fenotipos ligeros y moderados.

2.6. Conclusiones del capítulo

1. Las acciones de capacitación realizadas y el empleo de distintas vías de pesquisa permitieron elevar el número de pacientes con fenotipo clínico sugestivo de SLO.
2. La utilización de la CG/EM y/o la CCF para la detección de esteroides permitió el reconocimiento del fenotipo bioquímico del SLO y distinguir a los pacientes con esta enfermedad de aquellos con dismorfismos y alteraciones del neurodesarrollo similares pero resultantes de otros defectos genéticos y/o ambientales, lo que tiene gran importancia en el asesoramiento genético.
3. Las características clínicas más distintivas en los pacientes cubanos y por tanto más importantes para el diagnóstico del SLO son el retraso mental o sicomotor, los dismorfismos craneofaciales, la sindactilia 2-3 de los pies, la hipotonía y los trastornos de la alimentación en edades tempranas, las malformaciones genitales en los varones y las alteraciones de la conducta. Por su alta frecuencia y fácil identificación, la sindactilia 2-3 de los pies (independientemente de su magnitud) debe ser considerada como un signo de alerta incluso en pacientes con fenotipo muy sutil.

CAPÍTULO 3.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL SÍNDROME DE SMITH LEMLI OPITZ EN CUBA

CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DEL SÍNDROME DE SMITH LEMLI OPITZ EN CUBA

3.1. Introducción

A partir de la definición diagnóstica certera es posible hacer una caracterización genética de la enfermedad no realizada con anterioridad en el país que abarque aspectos genealógicos, poblacionales y moleculares. En relación con este último aspecto debe señalarse que no es hasta cuatro años después del inicio de esta investigación que comienzan a aparecer reportes en la literatura de análisis moleculares en pacientes con un origen étnico similar ^(74,76,211,212), lo cual hizo más complejo el estudio en los enfermos cubanos.

3.2. Objetivos

1. Describir el comportamiento genealógico y poblacional del SLO en Cuba.
2. Identificar las mutaciones patogénicas en el gen DHCR7 en pacientes cubanos con SLO.
3. Evaluar la posible existencia de un efecto de fundador del SLO en Cuba a través de la relación de las mutaciones patogénicas con los haplotipos SNPs en el gen DHCR7.

3.3. Materiales y métodos

El flujograma general seguido en esta tarea de investigación se muestra en el anexo 15.

3.3.1. Evaluación del comportamiento genealógico

3.3.1.1. Muestra

Estuvo conformada por 21 familias de igual número de pacientes con SLO, que no están genéticamente relacionados entre ellos.

3.3.1.2. Procedimiento

La información sobre las familias se obtuvo por medio de la entrevista a los padres de los 21 pacientes. Los árboles genealógicos fueron construidos a partir de una historia familiar detallada que incluyó al menos tres

generaciones para identificar relaciones de consanguinidad y la presencia de otros miembros afectados con SLO, retraso mental, malformaciones congénitas u otra enfermedad genética. Se interrogó acerca de la ocurrencia de abortos espontáneos, óbitos fetales y muertes postnatales entre los hermanos del propósito y se evaluó el color de la piel de los padres por observación.

Se realizó el cálculo de la frecuencia de consanguinidad del siguiente modo:

Frecuencia de consanguinidad = número de matrimonios consanguíneos/total de matrimonios estudiados × 100

Se hizo una evaluación de la concordancia entre la frecuencia esperada y la observada de hermanos afectados de acuerdo con el modo de herencia; para ello se determinó el número de hermanos nacidos vivos y totales (incluyendo los abortos espontáneos y óbitos fetales) del grupo de 21 enfermos y se calculó la probabilidad de hermanos afectados para cada grupo teniendo en cuenta que el riesgo de recurrencia es de $\frac{1}{4}$ o 0,25:

Probabilidad de hermanos nacidos vivos enfermos = total de hermanos nacidos vivos × 0,25

Probabilidad total de hermanos enfermos = total de hermanos × 0,25

Se evaluó el color de la piel de los progenitores de los 21 enfermos y se determinó el porcentaje de cada uno.

3.3.2. Evaluación del comportamiento poblacional

3.3.2.1. Muestra

Para el cálculo de la frecuencia fenotípica al nacimiento se consideraron el total de enfermos y de nacidos vivos en Cuba entre los años 1967 y 2011 (periodo en el cual nacieron los enfermos), que fueron: enfermos: 21, nacidos vivos: 7 536 837.

Para el cálculo de la frecuencia fenotípica al nacimiento por sexos se tuvieron en cuenta el total de enfermos y de nacidos vivos según sexos en Cuba entre 1967 y 2011, que fueron: varones enfermos: 15, nacidos vivos varones: 3 897 877; hembras enfermas: 6; nacidos vivos hembras: 3 638 960.

Para el cálculo de la frecuencia fenotípica al nacimiento por regiones geográficas se tomaron el total de enfermos y de nacidos vivos ocurridos entre 1981 y 2011 en cada región del país, que fueron: en el Occidente: enfermos: 6, nacidos vivos: 1 591 681; en el Centro: enfermos: 8, nacidos vivos: 1 132 314 y en el Oriente: enfermos: 4, nacidos vivos: 1 811 348.

Para el cálculo de la frecuencia fenotípica por prevalencia en población se utilizó el número de enfermos vivos y la población total de Cuba en el año 2011, que fueron: enfermos vivos: 18, población total: 11 247 925.

Para el cálculo de las frecuencias génicas y genotípicas se emplearon los datos de la población utilizada para el cálculo de la frecuencia fenotípica al nacimiento.

Los datos poblacionales utilizados se obtuvieron de la Oficina Nacional de Estadística e Información (ONEI) de la República de Cuba ⁽²¹³⁾.

3.3.2.2. Procedimiento

La frecuencia fenotípica de la enfermedad se estimó como frecuencia al nacimiento y como tasa de prevalencia.

Frecuencia fenotípica al nacimiento = total de enfermos nacidos entre 1967 y 2011/total de nacidos vivos en el país en ese mismo periodo. Se expresó en proporción.

Frecuencia fenotípica al nacimiento por sexos = número de enfermos de cada sexo nacidos entre 1967 y 2011/total de nacidos vivos del sexo correspondiente en el país en ese mismo periodo. Se expresó en proporción.

La frecuencia fenotípica al nacimiento por regiones geográficas se realizó para un período de 30 años (1981-2011), en los que se pudo obtener los datos de natalidad por provincias.

Frecuencia fenotípica al nacimiento por regiones geográficas = total de enfermos de la región geográfica nacidos entre 1981 y 2011/total de nacidos vivos correspondientes a esa misma región y periodo de tiempo. Se expresó en proporción.

Tasa de prevalencia de enfermos = total de enfermos vivos en el año 2011/población total del país en ese año × 100 000.

El cálculo de las frecuencias génicas y genotípicas se basó en la ley de Hardy Weinberg, que rige los principios de la Genética Poblacional ^(214,215). Se partió de las siguientes definiciones:

p = frecuencia del alelo normal (dominante)

q = frecuencia del alelo mutado (recesivo)

$$p + q = 1$$

La combinación de dos en dos de estos alelos generan los tres genotipos posibles:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Donde:

p^2 representa la frecuencia el genotipo homocigoto dominante (fenotípicamente normal)

$2pq$ representa la frecuencia del genotipo heterocigoto o portadores (fenotípicamente normal)

q^2 representa la frecuencia del genotipo homocigoto recesivo (fenotípicamente enfermo)

Entonces: si se conoce la frecuencia fenotípica de la enfermedad al nacimiento y esta coincide con la frecuencia del genotipo homocigoto recesivo (q^2) se calculó la frecuencia del alelo mutado (q), del siguiente modo:

$$q = \sqrt{q^2}$$

Si $p + q = 1$ entonces $p = 1 - q$

Con el conocimiento de las frecuencias de ambos alelos se estimaron las frecuencias de los genotipos homocigoto dominante (p^2) y heterocigoto ($2pq$)

La probabilidad de matrimonios entre portadores es $2pq \times 2pq$

3.3.3. Análisis de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7

3.3.3.1. Procedimiento para la obtención, conservación y traslado de ADN

El ADN se extrajo en el Laboratorio de Biología Molecular del CPGM-SS.

Se obtuvo a partir de leucocitos de sangre periférica de la muestra inicialmente tomada para estudio bioquímico que había sido centrifugada y el sedimento conservado a 4 °C. La extracción se realizó siguiendo las generalidades del método de precipitación salina con ligeras modificaciones. Cinco mL de sangre total se mezclaron con 10 mL de buffer (tris 0,01 M; sacarosa 0,32 M; MgCl₂ 0,0025 M; tritón 1 %; pH 8) para lisar los eritrocitos y posterior obtención de los leucocitos por centrifugación a 4 000 rpm por 15 min. Las células del sedimento se lavaron con 15 mL del buffer y se centrifugaron en las mismas condiciones. Posteriormente se lisaron agitando vigorosamente (menos de 10 min) con una mezcla de 2 mL de un segundo buffer (tris 0,25 M, Na₂EDTA 0,06 M; NaCl 0,15 M; SDS 1 %; pH 8) y 0,5 mL de NaClO₄ 5 M. El lisado se colocó a 65 °C en baño de maría por 25 min. Luego se le añadieron 2 mL de CHCl₃ (previamente en congelación) y se mezclaron fuertemente. Con posterioridad se centrifugó a 4 000 rpm por 15 min, se colectó la fase superior y se añadió suavemente en un tubo de cristal con 8 mL de etanol frío para precipitar el ADN. La medusa se colectó y se pasó a un tubo Eppendorf con 0,5 mL de etanol 70 % para su lavado. Se extrajo el etanol y se dejó secar. Se disolvió en 50-300 µL de agua. Se conservó a -20 °C hasta su uso.

Todas las sustancias químicas utilizadas eran de calidad de reactivo.

El envío de muestras de ADN al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad McMaster de Canadá se realizó por vía aérea en condiciones de refrigeración.

3.3.3.2. Identificación de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7

3.3.3.2.1. Etapa I

3.3.3.2.1.1. Muestra

Estuvo conformada por 10 pacientes con diagnóstico de SLO por CCF y CG/EM (pacientes n.ºs 1-10) y los progenitores de los enfermos n.ºs 2 y 7.

3.3.3.2.1.2. Procedimiento

Se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad McMaster de Canadá entre los años 2001 y 2004.

Las técnicas empleadas fueron: PCR-ARMS (para la búsqueda de las mutaciones T93M, IVS8-1G>C, W151X, V326L y R404C) y secuenciación de los exones tres al nueve y las vecindades exones-intrones del gen DHCR7 para detectar cambios de las bases nitrogenadas en relación con el gen DHCR7 salvaje ⁽²¹⁶⁾. Para ambas técnicas se siguieron los protocolos estandarizados en el mencionado laboratorio ⁽⁷²⁾.

3.3.3.2.2. Etapa II

3.3.3.2.2.1. Muestra

Estuvo conformada por 10 pacientes con diagnóstico de SLO por CCF (pacientes n.ºs 10-14 y 16-21). No se estudió el paciente n.º 15 por haber fallecido en el periodo neonatal y no disponerse de material biológico para la obtención de ADN.

3.3.3.2.2.2. Procedimiento

Se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del CPGM-SS entre los años 2005 al 2011.

Se utilizó la técnica de PCR-RFLP para investigar la presencia de la mutación IVS8-1G>C, según el método descrito por Battaile ⁽¹⁰⁵⁾. Se analizaron por PCR-ARMS, con cebadores diseñados en el propio laboratorio, las mutaciones IVS8-1G>C, T93M, F302L y D234Y. Se procedió como se describe a continuación:

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Biometra: 1×PCR buffer (Invitrogen), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 5 mM cada uno, set de cebadores correspondientes 0,4 μmol/μL cada uno, 1 U Taq pol (invitrogen), volumen total 25 μL.

Se realizan dos reacciones por cada mutación, correspondientes una al alelo mutado y la otra al salvaje, con el propósito de identificar el genotipo homocigoto o heterocigoto.

Mutación IVS8-1G>C:

Cebadores:

Común 5'- CAC AAC AGC CCT CAA GGT TGG TG -3'

Salvaje 5'- GTG GTA CAC CAA GTA CAG ACC G -3'

Mutante 5'- GTG GTA CAC CAA GTA CAG ACC **C** -3'

La reacción consistió en: 4 min a 94 °C seguidos por 20 ciclos (desnaturalización 1 min a 92 °C, alineamiento de los cebadores 0,5 min a 64 °C y extensión 0,5 min a 72 °C). Continúan 10 ciclos (desnaturalización 1 min a 92 °C, alineamiento de los cebadores 1 min a 55 °C y extensión 1 min a 72 °C) y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Mutación T93M:

Cebadores:

Común 5'- CCC AGT GTG ACT GCC TGC ATC CG -3'

Salvaje 5'- GAG CTG GGC TTT CCT CG -3'

Mutante 5'- GAG CTG GGC TTT CCT **CA** -3'

La reacción consistió en: 4 min a 94 °C seguidos por 25 ciclos (desnaturalización 1 min a 93 °C, alineamiento de los cebadores 0,5 min a 64 °C y extensión 0,5 min a 72 °C). Continúan cinco ciclos (desnaturalización 1 min a 93 °C, alineamiento de los cebadores 1 min a 55 °C y extensión 1 min a 72 °C) y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Mutación F302L:

Cebadores:

Común 5'- GCA GAT GTT AGG GAC ATA CT -3'

Salvaje 5'- ACA TCT GCC ATG ACC ACT TC -3'

Mutante 5'- ACA TCT GCC ATG ACC ACT **TG** -3'

La reacción consistió en: 4 min a 94 °C seguidos por 10 ciclos (desnaturalización 1 min a 92 °C, alineamiento de los cebadores 0,5 min a 60 °C y extensión 0,5 min a 72 °C). Continúan 20 ciclos (desnaturalización 1 min a 93 °C, alineamiento de los cebadores 1 min a 55 °C y extensión 1 min a 72 °C) y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Mutación D234Y:

Cebadores:

Común 5'- CTG CAG GAC GTT GAC CAG GA -3'

Salvaje 5'- TCG GAT CGG GAA GTG GTT TG -3'

Mutante 5'- TCG GAT CGG GAA GTG GTT **TT** -3'

La reacción consistió en: 4 min a 94 °C seguidos por 20 ciclos (desnaturalización 1 min a 92 °C, alineamiento de los cebadores 0,5 min a 60 °C y extensión 0,5 min a 72 °C). Continúan 10 ciclos (desnaturalización 1 min a 92 °C, alineamiento de los cebadores 1 min a 55 °C y extensión 1 min a 72 °C) y una extensión final de 5 min a 72 °C.

3.3.3.3. Determinación de las frecuencias génicas y genotípicas en los pacientes estudiados molecularmente

3.3.3.3.1. Muestra

Estuvo conformada por los 40 alelos procedentes de los 20 pacientes (20 genotipos) en los que se realizó el estudio de las mutaciones patogénicas en el gen DHCR7.

3.3.3.3.2. Procedimiento

El cálculo de las frecuencias génicas y genotípicas (observada y esperada) y en correspondencia con ellas el número de pacientes observados y esperados dentro del grupo de pacientes analizados molecularmente se realizó teniendo en cuenta las herramientas de la Genética Poblacional ^(214,215):

Frecuencia génica (de alelos mutados) = número de alelos que presentan una variante mutacional determinada/total de alelos estudiados.

Frecuencia genotípica observada = número de veces en que se encuentra representado un determinado genotipo/total de genotipos estudiados.

Frecuencia genotípica esperada = número de veces que debía estar representado un determinado genotipo de acuerdo a las frecuencias génicas encontradas/total de genotipos estudiados.

Pacientes observados = número de pacientes con un genotipo dado dentro del total de genotipos analizados.

Pacientes esperados = número de pacientes que debían tener un genotipo dado según las frecuencias génicas encontradas.

3.3.4. Evaluación del posible efecto de fundador de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7

3.3.4.1. Muestra

Se estudiaron 14 individuos, de ellos 10 pacientes (n.ºs 1-10) y los progenitores de los enfermos n.ºs 2 y 7.

3.3.4.2. Procedimiento

Se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad McMaster de Canadá entre los años 2001 y 2004.

Se identificaron ocho SNPs que ocupan las posiciones c.189, c.207, c.231, c.438, c.969, c.1 158, c.1 272 y c.1 350 en el gen DHCR7 por medio de secuenciación siguiendo el protocolo estandarizado en dicho laboratorio ⁽⁷²⁾. Estos SNPs se segregan formando diferentes haplotipos previamente reconocidos (anexo 16).

En cada paciente se pudo conocer el nucleótido (si fuera similar en ambos alelos) o los nucleótidos (de ser diferentes en ambos alelos) que ocupan cada una de las ocho posiciones intragénicas estudiadas.

Para la determinación de las fases en los dos pacientes en los que también se estudiaron a los padres se analizó qué mutación patogénica y qué polimorfismos provenían de uno u otro progenitor. Una vez identificada la combinación de SNPs de cada alelo del enfermo se reconoció el haplotipo por comparación con los reportados en la literatura (anexo 16). De ese modo quedó establecido qué haplotipo SNPs estaba ligado a cada mutación patogénica.

En la determinación de las fases en los pacientes en que no se dispuso de muestras parentales para el estudio se tuvo en cuenta si había homocigocidad para los haplotipos o si alguna de las mutaciones identificadas había sido reconocida en investigaciones previas como ligada a un único haplotipo, entonces se infirió un comportamiento similar en el paciente analizado y se consideró el segundo haplotipo como ligado a la otra mutación patogénica.

3.3.5. Definición de variables

- Consanguinidad parental: se define como la unión entre dos individuos cuya relación de parentesco es de primos segundos o más cercana ⁽²¹⁷⁾.

- Frecuencia de consanguinidad: proporción de parejas consanguíneas con respecto al total de matrimonios estudiados.
- Propósito: primer enfermo detectado en una familia.
- Antecedentes familiares: se refiere a la existencia o no de otros familiares de hasta tercer grado con retraso mental, malformaciones congénitas internas o externas o alguna enfermedad genética.
- Aborto espontáneo: pérdida de embarazo ocurrida de forma natural antes de las 20 semanas de EG.
- Óbito fetal: muerte fetal ocurrida de forma natural después de las 20 semanas de EG.
- Riesgo de recurrencia: probabilidad de que una enfermedad genética presente en una persona aparezca en otro miembro de la familia. En el SLO por tener herencia autosómica recesiva el riesgo de recurrencia para los descendientes de un matrimonio con un hijo previamente enfermo es de $\frac{1}{4}$ o 0,25 ⁽²¹⁸⁾.
- Color de la piel: se clasificó en blanca, negra o mestiza según la apreciación de la autora del trabajo o el especialista que evaluó al paciente y a los padres.
- Frecuencia fenotípica de la enfermedad: proporción de individuos enfermos en relación con la población de la que forman parte. Se calculó como frecuencia fenotípica al nacimiento y como prevalencia.
- Frecuencia génica: proporción en que se encuentra un alelo determinado en relación al total de alelos de la población en estudio para ese locus.
- Frecuencia genotípica: proporción en que se encuentra representado un genotipo (derivado de la combinación de dos en dos de los alelos del locus en cuestión) en relación con el total de genotipos (que se corresponde con el total de individuos estudiados).
- Regiones geográficas: se clasificó en Occidente (provincias desde Pinar del Río hasta Matanzas y el municipio especial Isla de la Juventud), Centro (desde Villa Clara hasta Camagüey) y Oriente (desde Las Tunas hasta Guantánamo).
- Presencia de la mutación IVS8-1G>C por PCR-RFLP. Se realizó PCR seguida por digestión con la enzima Scrfl. Se consideró homocigoto para la mutación: la presencia de una banda de 107 pb y una de 22 pb (no visible); heterocigoto: una banda de 107 pb, una de 70 pb, una de 37 pb (raramente visible) y una de

22 pb (no visible); y no presencia de la mutación: una banda de 70 pb, una 37 pb (raramente visible) una de 22 pb (no visible) ⁽¹⁰⁵⁾.

- Presencia de la mutaciones IVS8-1G>C, T93M, F302L y D234Y por PCR-ARMS. Se consideró homocigótico para la mutación en estudio: cuando amplifica solo con el cebador mutante, heterocigoto: cuando amplifica tanto con el cebador mutante como con el salvaje y no presencia de la mutación: cuando amplifica solamente con el cebador salvaje.

- Presencia de mutación genética por secuenciación: identificación de cambios en la secuencia de bases nitrogenadas en relación con el gen DHCR7 salvaje, que incluye tanto mutaciones patogénicas como silentes (SNPs).

- Heterogeneidad alélica: indica que la enfermedad es causada por al menos dos alelos mutados diferentes en un mismo locus.

- Homocigoto: se refiere a la presencia de dos alelos iguales, tanto del alelo normal como del mutado.

- Homocigoto recesivo: se refiere a los enfermos, que tienen ambos alelos mutados (independientemente de las variantes alélicas presentes).

- Heterocigoto o portador: se refiere a los individuos sanos que presentan dos alelos diferentes, uno mutado y el otro normal.

- Heterocigoto compuesto: se refiere a los enfermos con dos alelos mutados diferentes.

- Pacientes observados: número de pacientes estudiados que presentan un genotipo dado.

- Pacientes esperados: número de pacientes que debían observarse con un genotipo dado en la población estudiada según la ley de Hardy Weinberg, es decir resultantes de la frecuencia génica de los alelos que forman el genotipo en cuestión.

- SNPs: variantes genéticas caracterizadas por la sustitución de un único nucleótido, cuyo alelo minoritario tiene una frecuencia mayor al 1 % ⁽²¹⁹⁾.

- Ligamiento: cuando dos genes o polimorfismos genéticos se encuentran tan cerca uno de otro que la probabilidad de entrecruzamiento genético es mínimo o nulo y no ocurre una segregación independiente sino que tienden a hacerlo hacia un mismo gameto ⁽²²⁰⁾.

- Haplotipo SNPs: grupo de variantes genéticas debidas a sustituciones de un único nucleótido, que están muy próximas unas de otras y tienden a heredarse juntas.
- Desequilibrio de ligamiento: cosegregación con una frecuencia mayor de la esperada de una mutación con un haplotipo SNPs ⁽²²¹⁾.
- Fase: asignación del cromosoma en que se encuentra un alelo en particular en relación con los haplotipos SNPs que están ligados.

3.3.6. Recogida de los datos

Toda la información familiar, así como la derivada del estudio molecular fue registrada en el instrumento elaborado para aplicar a pacientes con diagnóstico confirmado de SLO (anexo 10).

3.3.7. Análisis y procesamiento de los datos

Se utilizaron estadísticas descriptivas para mostrar el comportamiento de las frecuencias de consanguinidad, el color de la piel de los progenitores, así como las frecuencias fenotípicas, génicas y genotípicas.

3.3.8. Limitaciones del estudio

La mayor limitación en esta etapa de la investigación radicó en la carencia de la tecnología requerida para el análisis molecular, específicamente la secuenciación, que impidió la identificación del genotipo en todos los enfermos y el estudio de los SNPs en la totalidad de los pacientes y sus progenitores, lo que unido al pequeño tamaño de la serie de casos (característico en las enfermedades raras) dificultó la evaluación de los resultados.

Además, las frecuencias fenotípicas y génicas calculadas en la población general pueden comprender infraestimaciones dadas por el probable subdiagnóstico de la enfermedad, no obstante constituyen una aproximación a dicho conocimiento por primera vez en Cuba.

3.4. Resultados

3.4.1. Evaluación del comportamiento genealógico

3.4.1.1. Consanguinidad

El análisis genealógico demostró existencia de consanguinidad parental en el paciente n.º 14, cuyos padres son primos segundos (quinto grado de parentesco), que tienen en común 1/32 genes (figura 9). Este matrimonio reside en una comunidad de la región montañosa del Escambray.

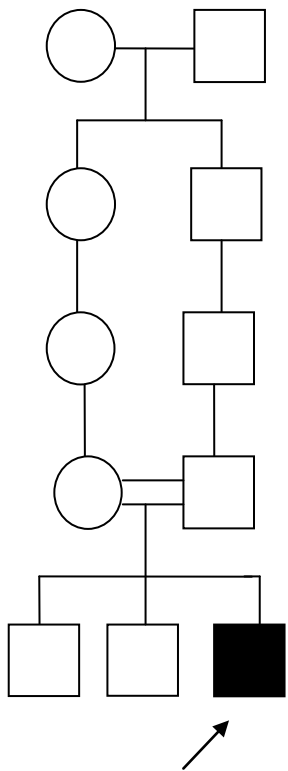
Por lo tanto la frecuencia de consanguinidad queda determinada por la presencia de un matrimonio consanguíneo entre los progenitores de los 21 pacientes, para una frecuencia de 4,7 %.

3.4.1.2. Antecedentes familiares y evaluación de la concordancia entre la frecuencia observada y la esperada de hermanos afectados

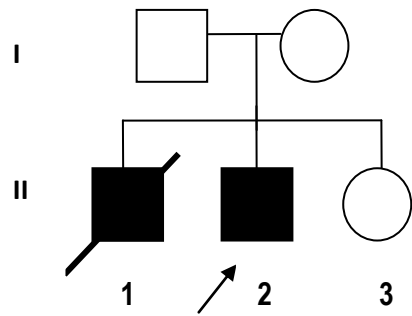
En el paciente n.º 16 se conoció que un hermano, nacido con anterioridad, había fallecido a los 4 meses con una cardiopatía congénita y polidactilia postaxial de ambas manos (figura 9). El niño nunca fue evaluado por especialistas en Genética Clínica, sin embargo por ser las anomalías referidas frecuentes en el SLO y tener una probabilidad de $\frac{1}{4}$ o 25 % de padecer la enfermedad debido a que es hijo de portadores, es posible que padeciera también SLO.

En el paciente n.º 21 se refirió una tía paterna fallecida a los 13 años que tenía retraso mental, dismorfia facial similar a la del propósito y sindactilia 2-3 de los pies, sin antecedente de esta última anomalía en otros miembros de la familia (figura 9). La niña tampoco fue evaluada por especialistas en Genética Clínica y no fue posible hacer análisis molecular a los padres de esa probable enferma de SLO para tratar de esclarecer el diagnóstico por esa vía.

Las madres de los pacientes n.ºs 3 y 8 tuvieron uno y tres abortos espontáneos, respectivamente, mientras que en el paciente n.º 7 se conoció que previo al nacimiento del propósito ocurrió el óbito de un feto de sexo femenino al término de la gestación asociado a un oligoamnios severo, pero no se refirieron malformaciones congénitas.

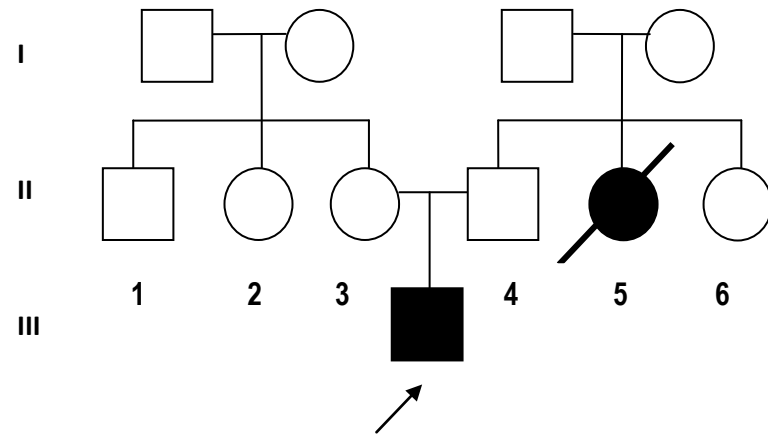


Familia del paciente n.º 14



Familia del paciente n.º 16

II-1 Falleció a los cuatro meses por cardiopatía congénita, tenía además polidactilia postaxial de ambas manos



Familia del paciente n.º 21

II-2 Falleció a los 13 años, tenía retraso mental, dismorfia facial similar a la del propósito y sindactilia 2-3 de los pies

Figura 9. Genealogías resumidas de los pacientes n.ºs 14, 16 y 21

El grupo de 21 enfermos tiene un total de 10 hermanos nacidos vivos, cinco de cada sexo. Solo uno de los hermanos (del paciente n.º 16), fallecido en el primer año de vida, tenía características clínicas sugestivas de SLO.

El total de hermanos (incluyendo los nacidos vivos, abortos espontáneos y óbitos fetales) es de 15 y como ya se mencionó, en solo uno se sospecha que haya padecido la enfermedad.

3.4.1.3. Color de la piel

De los 42 progenitores, 40 (95 %) fueron clasificados como de piel blanca y los dos restantes como mestizos.

3.4.2. Evaluación del comportamiento poblacional

3.4.2.1. Frecuencia fenotípica de la enfermedad

La frecuencia fenotípica del SLO al nacimiento en Cuba es de 1/358 897. En varones es de 1/259 858 y en hembras de 1/606 493 nacidos vivos.

En cuanto al comportamiento por regiones geográficas, los 21 enfermos se distribuyen en ocho provincias y el municipio especial Isla de la Juventud (tabla 11). Por orden de frecuencia se encuentran las provincias centrales (42,9 %), occidentales (38,1 %) y las orientales (19 %).

Una evaluación del número de nacidos vivos y de pacientes por provincias en 30 años (1981-2011) evidencia que la frecuencia fenotípica de la enfermedad es de 1/141 539 nacidos vivos en la región central, seguido de la región occidental con 1/265 280 y por último la oriental con 1/452 837.

La tasa de prevalencia de SLO en Cuba en el año 2011 era de 0,16 por cada 100 000 habitantes.

Tabla 11. Pacientes con diagnóstico confirmado de SLO según provincia de residencia

Provincia	Número de pacientes
Pinar del Río	1
Artemisa	1
La Habana	4
Matanzas	1
Cienfuegos	1
Villa Clara	6
Sancti Spíritus	2
Granma	4
Isla de la Juventud	1
Total	21

3.4.2.2. Frecuencias genotípicas y génicas

De acuerdo con la frecuencia fenotípica al nacimiento identificada en esta investigación, la frecuencia génica del alelo recesivo es de 0,0017 y la del alelo dominante es de 0,9983. En cuanto a los genotipos para el locus DHCR7 la frecuencia del homocigoto recesivo es 0,0000028 (0,00028 %), el homocigoto dominante es 0,997 (99,7 %) y el de heterocigotos (portadores) es 0,003394 (0,34 %). Este último se corresponde con 1/294 habitantes, por lo que la frecuencia de matrimonios entre portadores es de 1/86 436.

3.4.3. Análisis de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7

3.4.3.1. Identificación de mutaciones patogénicas

En la primera etapa de la investigación se detectaron mutaciones patogénicas en los 20 alelos analizados procedentes de los enfermos, mientras que en la segunda etapa se detectaron en 11 de 20 alelos. En total se estudiaron 40 alelos y se identificaron mutaciones en 31 (77,5 %).

Las mutaciones detectadas fueron: T93M, IVS8-1G>C, F302L, V281M y D234Y.

En los progenitores de los pacientes n.ºs 2 y 4 también se encontraron las mutaciones heredadas por sus descendientes.

3.4.3.2. Frecuencia de alelos mutados

En la tabla 12 se muestran las frecuencias de los alelos mutados en los pacientes cubanos. Las mayores corresponden a T93M y IVS8-1G>C que en conjunto representan el 70 % de todos los alelos estudiados.

Tabla 12. Frecuencia de alelos mutados en el locus DHCR7 de 20 pacientes cubanos *

Variantes mutacionales	T93M	IVS8-1G>C	F302L	V281M	D234Y
Número de alelos	17	11	1	1	1
Frecuencia alélica	0,425 (42,5 %)	0,275 (27,5 %)	0,025 (2,5 %)	0,025 (2,5 %)	0,025 (2,5 %)

* Se identificaron mutaciones en 31 de los 40 alelos estudiados

3.4.3.3. Frecuencias genotípicas en los enfermos

De los 20 pacientes estudiados, en 13 se identificaron las dos mutaciones causantes de la enfermedad, en cinco sólo una de ellas y en los dos restantes ninguna. De los 13 pacientes con ambas mutaciones identificadas, ocho son heterocigotos compuestos para las mutaciones T93M/IVS8-1G>C, dos son homocigotos para T93M y los tres restantes son heterocigotos compuestos para la mutación T93M con F302L, V281M y D234Y, respectivamente (tabla 13).

En la tabla 14 se muestran las frecuencias esperadas para los genotipos T93M/T93M, T93M/IVS8-1G>C y IVS8-1G>C/IVS8-1G>C de acuerdo con la ley de Hardy Weinberg y en correspondencia con ello el número de pacientes esperados, que es de cuatro, cinco y uno; respectivamente.

3.4.4. Evaluación del posible efecto de fundador de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7

En la tabla 15 se muestran los SNPs en ocho posiciones intragénicas de los 10 enfermos estudiados y en la tabla 16 los genotipos y haplotipos definidos a partir del análisis de los SNPs.

Como puede apreciarse en la tabla 16 en los dos pacientes heterocigotos compuestos en los que se realizó el análisis parental (pacientes n.ºs 2 y 7) se demostró que T93M está ligada al haplotipo J. En el paciente n.º 8 no se estudiaron los padres, pero es homocigoto para T93M y también para el haplotipo J.

En los restantes pacientes no se dispuso de muestras parentales para determinar los haplotipos y fases y se asumió el ligamiento de T93M al haplotipo J sobre la base del conocimiento previo de qué haplotipo está habitualmente ligado a la otra mutación con la que está formando el genotipo.

Tabla 13. Frecuencias genotípicas en 20 pacientes cubanos con SLO estudiados molecularmente *

Genotipo	Número de enfermos con el genotipo	Frecuencia genotípica
T93M/T93M	2	0,1 (10 %)
T93M/IVS8-1G>C	8	0,4 (40 %)
T93M/F302L	1	0,05 (5 %)
T93M/V281M	1	0,05 (5 %)
T93M/D234Y	1	0,05 (5 %)

* En siete pacientes no se pudo definir el genotipo. De ellos se identificó T93M y IVS8-1G>C en uno de los alelos en dos y tres pacientes, respectivamente. En dos pacientes no se identificaron mutaciones en ninguno de los alelos

Tabla 14. Pacientes observados y esperados según la ley de Hardy Weinberg para los genotipos T93M/T93M, T93M/IVS8-1G>C y IVS8-1G>C/IVS8-1G>C en 20 pacientes cubanos con SLO considerando una frecuencia génica de T93M y IVS8-1G>C de 0,42 y 0,27; respectivamente

Genotipo	Frecuencia genotípica esperada	Pacientes observados	Pacientes esperados
T93M/T93M	0,1764 (17,64 %)	2	4
T93M/IVS8-1G>C	0,2268 (22,68 %)	8	5
IVS8-1G>C/IVS8-1G>C	0,0729 (7,29 %)	0	1

Tabla 15. Resultados del estudio de secuenciación en ocho posiciones del gen DHCR7 con polimorfismos reconocidos en pacientes cubanos con SLO

Paciente nro.	c.189	c.207	c.231	c.438	c.969	c.1 158	c.1 272	c.1 350
1	A,G	C	C,T	C	G	C	T,C	C
2	G	C	C,T	C	G	C	C	C
3	A,G	C	C,T	C	G	C	T,C	C
4	A,G	C	C,T	C	G	C	T,C	C
5	A,G	C	C,T	C	G	C	T,C	C
6	G	C	C,T	C	G	C	C	C
7	A,G	C	C,T	C	G	C	T,C	C
8	G	C	T	C	G	C	C	C
9	A,G	C	C,T	C	G	C	T,C	C
10	A,G	C	C,T	C	G	C	T,C	C

Tabla 16. Genotipos DHCR7 y haplotipos SNPs en pacientes cubanos con SLO

Paciente n.º	Mutaciones	Haplotipos
1	T93M/IVS8-1G>C	J/A (D/F, C/E, B/L) ¶¶
2	T93M/V281M	J/F*
3	T93M/IVS8-1G>C	J/A (D/F, C/E, B/L) ¶¶
4	T93M/IVS8-1G>C	J/A (D/F, C/E, B/L) ¶¶
5	T93M/IVS8-1G>C	J/A (D/F, C/E, B/L) ¶¶
6	T93M/F302L	J/F
7	T93M/IVS8-1G>C	J/A*
8	T93M/T93M	J/J*
9	T93M/IVS8-1G>C	J/A (D/F, C/E, B/L) ¶¶
10	T93M/D234Y	J/A (D/F, C/E, B/L) ¶¶

* Pacientes para los cuales los haplotipos y las fases fueron establecidos

¶¶ Otros haplotipos posibles si las mutaciones T93M y IVS8-1G>C no estuvieran ligadas a los haplotipos J y A, respectivamente

3.5. Discusión

3.5.1. Evaluación del comportamiento genealógico

3.5.1.1. Consanguinidad

La única referencia encontrada de consanguinidad en población general cubana proviene de un estudio en la década del 50 del pasado siglo, según el cual era de 0,8 % ⁽²²²⁾, cifra que debe ser más baja en la actualidad debido a los cambios sociales ocurridos a partir de enero de 1959; por lo tanto, la frecuencia de consanguinidad en los progenitores de los pacientes con SLO de esta investigación (4,7 %) es alta en relación con la población general, pero muy próxima a la hallada entre los padres de las personas con discapacidad intelectual (5,2 %) detectada en el “Estudio psicosocial de las personas con discapacidades y estudio psicopedagógico, social y clínico genético de las personas con retraso mental en Cuba” realizado en el primer lustro del 2000 ⁽²²³⁾. No obstante, la frecuencia de consanguinidad encontrada en este estudio puede considerarse baja para una enfermedad de herencia autosómica recesiva rara debido a que las uniones consanguíneas elevan la probabilidad en la descendencia de homocigosis para un alelo recesivo mutado heredado de un ancestro común, por lo que mientras más rara es una enfermedad más probable es que los enfermos sean hijos de matrimonios consanguíneos ^(214,224). En cambio, la consanguinidad es relativamente baja cuando la frecuencia génica del alelo recesivo es alta y por tanto la de heterocigotos o portadores en la población también lo es ^(217,218,224-226).

Se describe que la consanguinidad es un fenómeno que ocurre más comúnmente en poblaciones aisladas, tanto por cuestiones culturales, religiosas como geográficas; esto último se observa en el único caso de esta investigación y coincide con los resultados del estudio clínico-genético realizado en Cuba referido con anterioridad ⁽²¹⁴⁾.

La consanguinidad es una condición poco común en los reportes internacionales de SLO ⁽¹⁵⁾. A su vez, estudios de las mutaciones más comunes del gen DHCR7 en población sana de origen caucásico de varios países han estimado una frecuencia de portadores de 2-3 % ^(72,103-107). Dos investigaciones publicadas en los años 2013 y 2014, basadas en la secuenciación del gen DHCR7, que abarcaron 15 825 y 8 918

norteamericanos de orígenes étnicos diversos, encontraron una frecuencia general de portadores de 1,5 % y 1,01 %, respectivamente ^(108,109).

3.5.1.2. Antecedentes familiares y evaluación de la concordancia entre la frecuencia observada y la esperada de hermanos afectados

Por la forma de herencia del SLO el mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad es para los hermanos, sin embargo en este estudio se sospecha la existencia de una tía también afectada. Existen reportes en la literatura de otros familiares enfermos, por ejemplo primos hermanos, que se ha interpretado como un elemento más a favor de que la frecuencia de portadores no es baja ^(15,18,51,110).

Entre los pacientes de este estudio solamente se sospechó la presencia de la enfermedad en uno de los hermanos, a pesar que se esperaban de dos a tres enfermos entre los hermanos nacidos vivos y de tres a cuatro entre los hermanos totales, de acuerdo con la forma de herencia del SLO. Sin embargo, el pequeño número de pacientes de esta investigación, así como de hermanos nacidos vivos y totales pueden generar diferencias debidas al azar entre el número de hermanos enfermos observados y esperados, pero también esas diferencias pueden resultar de la pérdida prenatal de esos enfermos, ya que las afecciones genéticas se encuentran entre las causas de abortos y óbitos fetales. En diversas publicaciones se refiere la discrepancia entre la frecuencia observada de SLO y la esperada a partir de los estudios de portadores, que se atribuye a las pérdidas prenatales o postnatales tempranas antes de la definición diagnóstica, además de los posibles casos con fenotipo muy ligero no diagnosticados ^(103,105,106,111,112,140).

3.5.1.3. Color de la piel

El hecho de que el 95 % de los progenitores de los pacientes de este estudio se clasificaran como de piel blanca contrasta con los resultados obtenidos en el Censo de población y viviendas del año 2012, según el cual en Cuba las personas de piel negra y mestiza representan algo más de la tercera parte (35,9 %) ⁽²¹³⁾.

Un estudio reciente de mestizaje de la población cubana encontró que la proporción de genes de origen europeo entre las personas de piel blanca, mestiza y negra es de 86; 63,8 y 29 %, respectivamente ⁽²²⁷⁾.

Los elementos anteriores apoyan la observación de que el SLO a pesar de ser considerada una condición panétnica, es más frecuente en poblaciones de origen caucásico ^(4,104).

3.5.2. Evaluación del comportamiento poblacional

3.5.2.1. Frecuencia fenotípica de la enfermedad

Como se puede apreciar la frecuencia fenotípica al nacimiento en los varones respecto a las hembras es de 2,4/1, a pesar de que en ese mismo periodo de tiempo la relación de nacidos vivos varones/hembras fue de 1,07/1 ⁽²¹³⁾. Por tratarse de una enfermedad autosómica recesiva la frecuencia esperada de enfermos es igual para ambos sexos, motivo por el cual en los años analizados debieron nacer como mínimo 30 niños con SLO, 15 de cada sexo, lo que implicaría una frecuencia fenotípica mínima de 0,0000040 (1/251 228 nacidos vivos).

Una situación similar del comportamiento por sexos en los pacientes cubanos se reporta en la literatura y se considera que resulta de una mayor facilidad para el diagnóstico en los varones por la alta frecuencia de anomalías genitales ^(51,53,59,110). Es decir, se trata de una enfermedad autosómica recesiva influida por el sexo, donde la probabilidad de padecer la enfermedad es similar para ambos géneros, pero la deficiencia de colesterol y como consecuencia la reducción de la síntesis de testosterona interfieren en el desarrollo de los genitales externos masculinos facilitando su diagnóstico (una situación contraria a la que ocurre en la hiperplasia adrenal congénita por deficiencia de la enzima 21 hidroxilasa ⁽²¹⁸⁾).

Según reportes internacionales la frecuencia fenotípica del SLO oscila entre 1/10 000 y 1/70 000 nacidos vivos en poblaciones de origen caucásico ⁽⁴⁾. La enfermedad es mucho más rara en Asia, África y Suramérica ^(15,101,102). No se encontraron publicaciones sobre estudios de frecuencia en población española o descendiente de ésta u otra con un origen étnico similar.

En cuanto a la frecuencia fenotípica por regiones geográficas, si se tiene en cuenta que el SLO es más común en poblaciones de origen caucásico, estos resultados son los esperados de acuerdo con los datos de color de la piel derivados de los censos de población y viviendas de los años 1981, 2002 y 2012 ⁽²¹³⁾, en los que se evidencia que la mayor y menor proporción de habitantes de piel blanca se encuentran en el centro y el oriente del país, respectivamente. Como ya se refirió en el acápite 3.5.1.3, la mayor proporción de genes de origen europeo en la población cubana se encuentra en las personas de piel blanca ⁽²²⁷⁾. Otros factores que pueden influir en estos resultados son: la habilidad clínica para el diagnóstico (ya que en las

enfermedades raras el conocimiento de un caso facilita la identificación de otros) y la menor cobertura de pesquisa en instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual en el oriente del país.

Según la tasa de prevalencia en el año 2011 (0,16 por cada 100 000 habitantes), el SLO en Cuba es una enfermedad rara de acuerdo con los criterios internacionales ⁽³⁷⁾.

3.5.2.2. Frecuencias genotípicas y génicas

Como se mencionó en el acápite 3.5.1.1 la frecuencia de portadores estimada en poblaciones caucásicas varía entre 1 y 3 %. La única referencia encontrada de frecuencia de portadores en población de origen hispano proviene de una investigación publicada por Lazarin y cols. en el 2013 ⁽¹⁰⁸⁾ basada en la secuenciación del gen DHCR7 en norteamericanos, que es de 0,7 % o 1/143, el doble de la encontrada en los pacientes cubanos (0,34 % o 1/294). Sin embargo estos resultados no son comparables porque la forma de obtención del dato es diferente. Tampoco se debe asumir que la frecuencia de portadores en la población cubana de origen hispano sea similar a la encontrada en los Estados Unidos, hacia donde ha ocurrido una gran migración procedente de la región del Caribe, Centro y Suramérica, cuyos pobladores a pesar de tener una mezcla de genes europeos, africanos y amerindios, las proporciones entre ellos son variables. Por ejemplo, en Centroamérica y América del Sur hay un componente de genes nativos o amerindios significativamente mayor que en Cuba ⁽²²⁸⁻²²⁹⁾.

3.5.3. Análisis de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7

3.5.3.1. Identificación de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7

La diferencia en el número de alelos con mutaciones patogénicas identificadas entre una y otra etapa de la investigación obedece a cuestiones técnicas ya que en la primera se realizó, además de PCR-ARMS para algunas mutaciones específicas, la secuenciación de los exones y las vecindades exones-intrones del gen DHCR7 elevando con ello a más del 95 % la probabilidad de identificación de mutaciones ⁽¹⁴⁾; mientras que en la segunda etapa solamente se investigaron cuatro mutaciones por PCR-ARMS y PCR-RFLP.

A continuación se hace una breve descripción de las mutaciones identificadas en los pacientes cubanos.

T93M es una sustitución de citosina por timina en la posición 278 del exón cuatro que produce un cambio treonina (aa conservado) por metionina en la posición 93 de la enzima, próximo al segundo dominio transmembranal ^(14,70).

IVS8-1G>C es una mutación sin sentido que se localiza en la última base del intrón ocho, ocasionando una disrupción en el sitio de empalme con la aparición de otro alternativo cadena arriba. El empalme alternativo resulta en la inserción de 134 pb de la secuencia del intrón, produciendo un corrimiento del marco de lectura y la aparición de un codón de terminación prematuro y como consecuencia una proteína truncada que carece de 154 aa de su extremo C-terminal, por lo que se considera una mutación nula ^(14,70).

F302L es una sustitución de citosina por guanina en la posición 906 (exón ocho) que origina un cambio de fenilalanina por leucina en la posición 302 de la cadena polipeptídica, adyacente al sexto dominio transmembranal ^(14,70).

La mutación V281M es producto de la sustitución de guanina por adenina en la posición 841 (exón ocho) que conduce a un cambio del aa valina por metionina en la posición 281 de la enzima, que forma parte del sexto dominio transmembranal ^(14,70).

La sustitución de guanina por timina en la posición 700 (exón siete) que conduce a un cambio de ácido aspártico por tirosina en la posición 234 de la proteína se conoce como D234Y. El ácido aspártico es un aa conservado que está adyacente al quinto dominio transmembranal de la enzima ⁽¹⁴⁾.

3.5.3.2. Frecuencia de alelos mutados

A través del anexo 17 se puede establecer una comparación entre la frecuencia de los alelos encontrados en los pacientes cubanos con la de otras series de casos publicados procedentes de diferentes países.

Como puede notarse T93M es la mutación predominante en los enfermos cubanos y una de las más comunes internacionalmente, encontrándose en alrededor del 10 % de los pacientes, pero con mayor presencia en el sur de Europa (Turkía, Italia, España, Portugal) y también en Brasil ^(3,78,211,212). Los resultados encontrados en este estudio ubican a Cuba como el país con más alta frecuencia de esta mutación hasta ahora conocida. Es llamativo que ésta representa 2,5 veces la observada en España. Si se tienen en cuenta los siguientes aspectos: a) Cuba fue colonizada por los españoles, en un proceso que

tuvo sus inicios a finales del siglo XV, la población aborigen fue prácticamente exterminada y con posterioridad la trata de esclavos ocasionó una notable introducción de personas de origen africano ⁽²²⁷⁾, b) en la población cubana general el 72 % de los genes son de origen caucásico, el 20 % africano y el 8 % amerindio ⁽²²⁷⁾, c) el 95 % de los progenitores de los pacientes de este estudio clasificaron como de piel blanca y el 5 % restante como mestizos. Entonces, cómo explicar esa diferencia entre la frecuencia del alelo T93M entre Cuba y España. La presencia de mutaciones en el gen DHCR7 en la población cubana es un reflejo del flujo genético ocasionado por las olas migratorias procedentes de España, no así de África donde el SLO parece ser una enfermedad muy rara ⁽²¹¹⁾. Sin embargo, la explicación más probable para la discordancia de frecuencias entre ambas poblaciones es la deriva genética, un fenómeno caracterizado por el efecto acumulativo de las fluctuaciones génicas durante muchas generaciones, fundamentalmente en poblaciones pequeñas, y que ocasiona que dos o más poblaciones se diferencien genéticamente. Es decir, es posible que por azar los gametos con el alelo T93M participaran más en la fecundación durante varias generaciones y de esa manera se alcanzara una mayor frecuencia que en la población de la cual provinieron. Otra explicación es una forma particular de deriva genética conocida como efecto de fundador. En ese caso, los inmigrantes españoles que colonizaron nuestro país constituyeron una pequeña muestra que por azar no era representativa de la diversidad genética de la población originaria, sino que tenía una frecuencia mayor de T93M, diferencia que se acrecentó en el transcurso de múltiples generaciones ^(214,230). La mutación IVS8-1G>C está presente en cerca de 1/3 de los alelos de pacientes cubanos, ocupando el segundo lugar, y su frecuencia (27,5 %) es ligeramente inferior a las reportadas globalmente y en España. Es la más común en el mundo, apareciendo en alrededor del 35 % de los pacientes de diferentes poblaciones. En Europa su frecuencia va disminuyendo hacia el este y sudeste hasta ser rara en Polonia, Eslovaquia y Turkía ^(3,74,211,231).

F302L tiene una frecuencia de 2,5 % en pacientes cubanos a pesar que representa aproximadamente el 15 % de las mutaciones en España, pero es muy rara en otras poblaciones ^(74,211). Por el origen étnico de los pacientes cubanos podría esperarse una frecuencia mayor de esta mutación. La diferencia encontrada también puede explicarse por los efectos de la deriva genética ⁽²³⁰⁾.

La mutación V281M es rara y se ha referido solamente en pacientes norteamericanos ⁽¹⁵⁾.

La mutación D234Y ha sido reportada únicamente en el paciente n.º 10 de esta investigación ⁽¹⁴⁾.

3.5.3.3. Frecuencias genotípicas en los enfermos

Se observó una discrepancia entre el número de enfermos observados y los esperados de acuerdo a la ley de Hardy Weinberg. Los heterocigotos compuestos T93M//IVS8-1G>C exceden a lo esperado, contrario a lo que ocurre para los homocigotos para T93M y IVS8-1G>C, pero por el pequeño tamaño de la muestra no puede realizarse un análisis estadístico. Se realizó una evaluación conjunta 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). En el anexo 18 se muestran los resultados de este análisis, que como puede notarse son similares a los encontrados en pacientes cubanos de manera independiente.

En otras investigaciones también se han observado discordancias entre las frecuencias observadas y esperadas para genotipos homocigotos y heterocigotos. Por ejemplo, en un metanálisis realizado por Kelley y Herman en el año 2001 ⁽¹⁴⁰⁾ que incluyó a 179 pacientes, encontraron 9 homocigotos para IVS8-1G>C comparado con 18 esperados. En cambio, se duplicaba el número de heterocigotos compuestos IVS8-1G>C con cuatro mutaciones con sentido (T93M, V326L, R352W, R404C), situación que no ocurrió en combinación con la mutación sin sentido (nula) W151X. También este estudio mostró un escaso número de homocigotos para W151X y un mayor número de pacientes observados que esperados en heterocigosis con las mutaciones con sentido mencionadas previamente. Sobre la base de estas observaciones los autores plantearon que la verdadera frecuencia de dichas mutaciones debe ser mayor que la calculada a partir de los genotipos observados.

En un análisis que se realizó a partir de 244 casos revisados por Waterham y Hennekam en el 2012 ⁽¹⁴⁾, se encontró una frecuencia de alelos nulos de 0,39 y de 0,61 la de mutaciones con sentido. Esas frecuencias génicas implican una frecuencia de homocigotos para alelos nulos de 15 %, de homocigotos para mutaciones con sentido de 37 % y de heterocigotos de 48 %, que se corresponderían en esa población con

37, 90 y 117 pacientes respectivamente, sin embargo en cada una de los genotipos se observaron 20, 76 y 148 pacientes.

Una explicación probable para estas observaciones es el hecho de que tanto IVS8-1G>C como W151X son mutaciones nulas que abolen la actividad enzimática, por tanto lo esperado es que la presencia en homocigosis o heterocigosis compuesta entre este tipo de mutaciones se asocien a niveles de colesterol muy bajos y generen los fenotipos más graves. Una prueba de ello es que todos los homocigotos para IVS8-1G>C publicados han sido fetos polimalformados o niños pequeños con un fenotipo severo que han muerto tempranamente ^(45,50,53,191), como ocurrió con el único caso encontrado en el análisis conjunto con otras series de pacientes donde IVS8-1G>C y T93M constituyen las mutaciones predominantes ⁽²¹²⁾. Una situación similar se presenta para homocigotos o heterocigotos compuestos para otras mutaciones nulas ^(45,53,192).

Estudios de varias mutaciones con sentido, muestran la existencia de actividad enzimática residual ⁽⁴⁵⁾ y también su asociación de manera general con una menor severidad fenotípica ⁽⁴⁾. En los heterocigotos compuestos entre mutaciones nulas y con sentido, los parámetros bioquímicos y la severidad clínica se relacionan con la segunda mutación y comúnmente se asocian a cuadros clínicos moderados y ligeros ^(14,53). Además se ha observado que mutaciones con sentido, que conservan cierto grado de actividad residual, incluyendo las transmembranales (como T93M), en homocigosis suelen a asociarse a fenotipos más ligeros que cuando están en heterocigosis compuesta con mutaciones nulas ⁽⁵³⁾ y probablemente algunos pacientes tengan cuadros clínicos tan sutiles que no sean diagnosticados y ocasionen esa discrepancia entre la frecuencia observada y la esperada de acuerdo a su frecuencia génica. Una muestra de ello es el paciente n.º 14 de esta investigación, homocigoto para T93M con un fenotipo no clásico.

3.5.4. Evaluación el posible efecto de fundador de mutaciones patogénicas en el gen DHCR7

En los pacientes n.ºs 2, 7 y 8 quedó demostrado el ligamiento de la mutación T93M al haplotipo J.

El paciente n.º 6 es heterocigoto compuesto para T93M y F302L y el análisis de los SNPs da posibilidad de dos haplotipos: F y J. Como que la segunda de las mutaciones patogénicas siempre se ha encontrado ligada al haplotipo F ⁽²¹¹⁾, entonces T93M debe estarlo al haplotipo J.

En otros cinco pacientes T93M está en heterocigosis compuesta con IVS8-1G>C, una mutación reportada en muchos grupos étnicos, incluidos afroamericanos, y que siempre se ha encontrado ligada al haplotipo A, por lo que se piensa que es producto de un único evento mutacional o de su recurrencia sobre un mismo haplotipo (72,73,211,232). Si se asume que la mutación IVS8-1G>C está ligada al haplotipo A en estos pacientes cubanos, la mutación T93M lo está al haplotipo J.

En la paciente n.º 10, con una mutación no conocida con anterioridad, se consideró como más probable el ligamiento de T93M al haplotipo J, teniendo en cuenta lo estimado en el resto de los pacientes.

En estos enfermos en los que no se pudo realizar el análisis parental no es posible asegurar los haplotipos y fases por lo que quedaron como probables otras combinaciones.

En estudios internacionales el ligamiento 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 (74,76,78,211,212,233). Sin embargo, el análisis de haplotipos en alelos normales, incluyendo a personas con ancestros del Mediterráneo, demuestran que el haplotipo J es poco común (5-8 % de los alelos) (211,233). Es decir, hay desequilibrio de ligamiento entre T93M y el haplotipo J, lo que evidencia un efecto de fundador (221).

Witsch-Baumgartner y cols. (74) encontraron dos alelos, de un paciente español y otro italiano, con T93M ligado al haplotipo F, que difiere del J en una sola posición, c.231. Por lo tanto T93M pudo haber ocurrido originariamente en un alelo con haplotipo J y posteriormente ocurrir una nueva mutación para convertirse en haplotipo F o puede ser una mutación recurrente en esta región del Mediterráneo como lo demuestra también el ligamiento de esta mutación al haplotipo A vista en tres pacientes turcos, dos de ellos hermanos (78). En pacientes de origen noreuropeo la mutación T93M está ligada a los haplotipos A, B, E y K (73,233).

La mutación T93M afecta a dinucleótidos CpG (ACG->ATG, Thr->Met) y su ligamiento a más de un haplotipo sugiere la ocurrencia de varios eventos mutacionales (211,233).

En otro estudio también realizado por Witsch-Baumgartner y cols. se estimó que la mutación T93M sobre el haplotipo J ocurrió entre 5 800 y 6 200 años antes de Cristo, época de una fuerte migración de las tribus neolíticas desde el Oriente Medio hacia el oeste, lo que explica la presencia de dicho alelo por todo el norte

del mar Mediterráneo ⁽²¹¹⁾ y en una historia más reciente, su introducción en el continente americano producto de la colonización española y portuguesa.

En Cuba el aparente ligamiento de la mutación T93M al haplotipo J sugiere que esta mutación proviene de una misma fuente ancestral y por tanto es el reflejo de un efecto de fundador ^(211,230,233).

3.6. Conclusiones del capítulo

1. La baja frecuencia de consanguinidad entre los progenitores de los pacientes y la sospecha de otro miembro de una familia (no hermano) afectado sugieren que la frecuencia de portadores de alelos mutados del gen DHCR7 es relativamente alta, lo que sumado a la más baja detección del fenotipo en las hembras y a la diferencia entre el número de pacientes observados y esperados con los genotipos formados por los dos alelos más comunes (T93M y IVS8-1G>C), permiten plantear que la verdadera frecuencia del SLO en Cuba es mayor que la encontrada en esta investigación.
2. El predominio de progenitores de piel blanca y la mayor frecuencia de enfermos en la región central del país (la de mayor proporción de personas blancas y de genes de origen europeo) apoya las observaciones obtenidas en investigaciones internacionales de que el SLO es más común en poblaciones de origen caucásico.
3. Por medio del estudio molecular se identificó a la mutación T93M como la predominante en pacientes cubanos, cuya frecuencia es la más alta internacionalmente, así como la presencia de al menos otras cinco variantes alélicas, incluyendo una no conocida con anterioridad, que demuestran la heterogeneidad en el locus DHCR7 en Cuba.
4. El ligamiento de la mutación T93M al haplotipo J, sugiere un posible efecto de fundador de dicha mutación en Cuba.

CAPÍTULO 4.

CORRELACIÓN ENTRE LOS FENOTIPOS BIOQUÍMICO Y CLÍNICO Y EL GENOTIPO DHCR7

CAPÍTULO 4. CORRELACIÓN ENTRE LOS FENOTIPOS BIOQUÍMICO Y CLÍNICO Y EL GENOTIPO DHCR7

4.1. Introducción

Una vez realizada la caracterización de los fenotipos clínico y bioquímico de los pacientes así como la identificación de las mutaciones patogénicas, evaluar el modo en que se correlacionan estos tres elementos puede aportar conocimientos acerca del efecto directo de los diferentes genotipos DHCR7 sobre la vía de síntesis del colesterol (medido a través de los dos metabolitos directamente relacionados con la deficiencia de la enzima 7DHCR: 7DHC y colesterol), y secundariamente en la expresión clínica de la enfermedad.

4.2. Objetivos

1. Correlacionar los fenotipos bioquímico y clínico.
2. Correlacionar el fenotipo bioquímico con el genotipo DHCR7.
3. Correlacionar el fenotipo clínico con el genotipo DHCR7.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Obtención de los datos primarios

Toda la información utilizada para los análisis de correlación que se explican en los acápite 4.3.2, 4.3.3 y 4.3.4, que son los valores de 7DHC y colesterol, el puntaje de severidad clínica y el genotipo DHCR7, proceden de los resultados de etapas anteriores de la investigación y que fueron registrados en el instrumento elaborado para aplicar a pacientes con diagnóstico confirmado de SLO (anexo 10).

4.3.2. Correlación entre los fenotipos bioquímico y clínico

4.3.2.1. Muestra

Se analizaron los 10 pacientes (n.^{os} 1-10) en los que se conocen tanto los valores de los parámetros bioquímicos (7DHC y colesterol) como el puntaje de severidad clínica.

4.3.2.2. Procedimiento

Se realizó un análisis de las distribuciones de los parámetros bioquímicos (7DHC y colesterol) y del puntaje de severidad clínica utilizando la estadística descriptiva. Dicho análisis se soportó en la determinación del recorrido de valores de las variables, apoyado por el cálculo de posición (cuartiles), de tendencia central (media y mediana) y de variación (desviación estándar, coeficiente de variación y rango). También se calculó el coeficiente de correlación lineal de Pearson para indagar sobre una posible correlación lineal entre el colesterol y el 7DHC, así como entre estos y el puntaje de severidad clínica.

4.3.3. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7

4.3.3.1. Muestra

Estuvo conformada por los 10 pacientes (n.^{os} 1-10) en los que se conocen tanto los valores de los parámetros bioquímicos (7DHC y colesterol) como el genotipo DHCR7.

4.3.3 2. Procedimiento

Utilizando la estadística descriptiva se realizó un análisis de la distribución de los parámetros bioquímicos (7DHC y colesterol), que se soportó en la determinación del recorrido de valores de las variables, apoyado por el cálculo de posición (cuartiles), de tendencia central (media y mediana) y de variación (desviación estándar, coeficiente de variación y rango). Se evaluó el comportamiento de estos parámetros bioquímicos entre los pacientes con el mismo grupo genotípico (TM/0 y TM/TM) y entre los que tienen un genotipo DHCR7 idéntico.

4.3.4. Correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo DHCR7

4.3.4.1. Muestra

El análisis se realizó en 13 pacientes (n.^{os} 1-10 y 12, 14 y 20) en los que se conocen tanto el puntaje de severidad clínica como el genotipo DHCR7.

4.3.4.2. Procedimiento

Utilizando la estadística descriptiva se realizó un análisis de la distribución del puntaje de severidad clínica basado en la determinación del recorrido de los valores de esta variable, apoyado por el cálculo de posición (cuartiles), de tendencia central (media y mediana) y de variación (desviación estándar, coeficiente de variación y rango). Se evaluó el comportamiento del puntaje de severidad clínica entre los pacientes con el mismo grupo genotípico (TM/0 y TM/TM) y entre los que tienen un genotipo DHCR7 idéntico.

4.3.5. Definición de variables

- Fenotipo clínico: puntaje de severidad clínica de la enfermedad según el método propuesto por Kelley y Hennekam ⁽¹⁵⁾. Se clasifica en ligero, moderado y severo cuando el valor del puntaje es: \leq a 20, entre 21 y 50 y $>$ 50, respectivamente.
- Fenotipo bioquímico: valores de colesterol y de 7DHC en $\mu\text{mol/L}$ determinados por CG/EM.
- Genotipo DHCR7: combinación de dos mutaciones patogénicas en el gen DHCR7.
- Grupo genotípico: clasificación basada en el efecto de las mutaciones que forman el genotipo DHCR7 sobre la actividad enzimática, las mutaciones sin sentido o en los sitios de empalme que resultan en alelos nulos (0) y mutaciones con sentido que generan cambios aminoacídicos en los dominios transmembranales o próximas a ellos (TM). Los genotipos quedaron clasificados en dos grupos: TM/0 y TM/TM.
- Genotipo DHCR7 idéntico: pacientes que tienen igual combinación de alelos mutados en el gen DHCR7.

4.3.6. Limitaciones del estudio

La principal limitante en esta etapa de la investigación está relacionada con la carencia de tecnología para la cuantificación de esteroides y para el estudio molecular, que impide el conocimiento más preciso del fenotipo bioquímico y del genotipo DHCR7 en todos los pacientes. Lo anterior reduce aún más la muestra (de por sí pequeña por tratarse de una enfermedad de baja prevalencia) y dificulta el análisis de los resultados. No obstante, este estudio representa una aproximación al conocimiento de este tema en pacientes cubanos.

4.4. Resultados

En la tabla 17 se muestran los pacientes incluidos en el análisis con sus respectivos puntajes de severidad clínica, valores de colesterol y 7DHC y el genotipo DHCR7.

4.4.1. Correlación entre los fenotipos bioquímico y clínico

Según se muestra en la tabla 18 la totalidad de los pacientes estudiados poseen un puntaje de severidad clínica ligero o moderado (mínimo=10, máximo=28) y los niveles medios de colesterol y 7DHC son de 2 510 $\mu\text{mol/L}$ y 489 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

Por otra parte, un análisis del valor que experimenta el coeficiente de correlación lineal entre los parámetros bioquímicos (7DHC y colesterol, $r=-0,035$; $p=0,92$), y entre éstos y el puntaje de severidad clínica [7DHC ($r=0,492$; $p=0,14$), colesterol ($r=-0,128$; $p=0,72$)], que se muestran en la tabla 19, sugiere la posible existencia de un patrón de correlación lineal inversa entre el colesterol y el 7DHC y entre el colesterol y la severidad clínica, y una correlación lineal positiva o directa entre el 7DHC y la severidad clínica; estos resultados poseen una significación clínica a pesar que dichas correlaciones no resultan estadísticamente significativas ($p>0,05$). Si bien ese es el comportamiento general en la muestra, un análisis más individualizado permite identificar cómo pacientes con cifras similares de colesterol se diferencian de manera sensible en cuanto a sus valores de 7DHC (pacientes n.ºs 2 y 3) y cómo el paciente n.º 4 con el más alto puntaje de severidad clínica tiene uno de los valores más altos de colesterol y el mayor de 7DHC (tabla 17).

4.4.2. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7

4.4.2.1. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7 según grupo genotípico

Respecto al patrón de comportamiento experimentado por los parámetros bioquímicos (colesterol y 7DHC) según el tipo de genotipo (TM/0 y TM/TM) (tabla 20), los resultados indican que en el grupo de cuatro pacientes con genotipo TM/TM los niveles medios de colesterol son ligeramente superiores (mediana 2 640, media 2 030) en relación con el grupo de seis pacientes que presentan el genotipo TM/0 (mediana 2 510, media 1 890). Aunque el rango de variación ($R=\text{máximo}-\text{mínimo}$) fue mayor en el grupo TM/TM ($R=1 590$) respecto al TM/0 ($R=897$), ambos tuvieron una desviación estándar (DE) y un coeficiente de variación (CV) con valores similares. Se observa solapamiento de los valores entre ambos grupos genotípicos.

Tabla 17. Puntaje de severidad clínica, fenotipo bioquímico y genotipo DHCR7 en pacientes cubanos con SLO *

Paciente n.º	Puntaje de severidad clínica	Fenotipo bioquímico		Genotipo	
		Colesterol (µmol/L)	7DHC (µmol/L)	Mutaciones detectadas	Clasificación de mutaciones
1	17	2 170	311	T93M/IVS8-1G>C	TM/0
2	17	1 240	596	T93M/V281M	TM/TM
3	22	1 160	276	T93M/IVS8-1G>C	TM/0
4	28	2 500	599	T93M/IVS8-1G>C	TM/0
5	11	1 650	427	T93M/IVS8-1G>C	TM/0
6	11	1 980	219	T93M/F302L	TM/TM
7	17	2 570	454	T93M/IVS8-1G>C	TM/0
8	17	2 070	302	T93M/T93M	TM/TM
9	19	1 300	367	T93M/IVS8-1G>C	TM/0
10	10	2 830	283	T93M/D234Y	TM/TM
12	20			T93M/IVS8-1G>C	TM/0
14	10			T93M/T93M	TM/TM
20	17			T93M/IVS8-1G>C	TM/0

* Se incluyeron aquí los 13 pacientes de la investigación en los que se conoce al menos dos de las variables a analizar

Tabla 18. Comportamiento de los parámetros bioquímicos (colesterol y 7DHC) y puntaje de severidad clínica en 10 pacientes cubanos con SLO *

Variable	MI	MA	Q1	Q2	Q3	ME	DE	CV
Colesterol ($\mu\text{mol/L}$)	1 160	2 830	1 280	2 020	2 510	1 940	590	0,3
7DHC ($\mu\text{mol/L}$)	219	599	281,25	339	489	383,4	133,06	0,34
Puntaje de severidad clínica	10	28	11	17	19,75	16,9	5,49	0,32

MI: mínimo valor, MA: máximo valor, Q1: percentil 25 %, Q2: mediana, Q3: percentil 75 %
 ME: media, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

* Corresponde a los 10 pacientes de la investigación en que se conocen tanto el valor de colesterol y 7DHC como el puntaje de severidad clínica

Tabla 19. Coeficiente de correlación lineal entre los niveles de colesterol, 7DHC y puntaje de severidad clínica en 10 pacientes cubanos con SLO *

Variable	Coeficiente de correlación de Pearson (p valor)	
	7DHC ($\mu\text{mol/L}$)	Puntaje de severidad clínica
Colesterol ($\mu\text{mol/L}$)	- 0,035 (0,92)	- 0,128 (0,72)
7DHC ($\mu\text{mol/L}$)		0,492 (0,14)

Cálculo basado en el método de Monte Carlo

* Corresponde a los 10 pacientes de la investigación en los que se conocen los valores de colesterol y 7DHC (estudiados por CG/EM)

En cuanto al 7DHC, los pacientes con genotipo TM/0 tienen niveles medios levemente superiores (mediana 397, media 405,66) en comparación con los del genotipo TM/TM (mediana 392,5; media 350). Al igual que para el colesterol, existe solapamiento en el rango de valores observados (mínimo-máximo) del 7DHC en ambos grupos genotípicos, lo cual se debe a que en el segundo grupo existe una mayor dispersión de los valores en relación al centro de la distribución observada [CV=0,29 (TM/0) y CV=0,48 (TM/TM)].

4.4.2.2. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7 idéntico

En esta serie de casos solo existen seis pacientes con igual genotipo, T93M/IVS8-1G>C, (que se corresponde con la totalidad del grupo genotípico TM/0), en los que se tenga conocimiento de sus valores de colesterol y 7DHC. Como puede apreciarse en la tabla 20 hay variaciones ostensibles en los niveles de estos metabolitos entre los afectados, fundamentalmente para el 7DHC.

4.4.3. Correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo DHCR7

4.4.3.1. Correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo DHCR7 según grupo genotípico

En la tabla 21 puede apreciarse que en los pacientes cubanos el puntaje de severidad clínica (independientemente de que tanto en el grupo TM/0 como en el TM/TM puede clasificarse como ligero si se toman como referencia los valores que experimentan los estadígrafos de tendencia central) tiene un patrón de comportamiento caracterizado por niveles medios ligeramente superiores en el grupo de pacientes con el genotipo TM/0 (mediana 18, media 18,88) en comparación con los alcanzados en el grupo que presenta el genotipo TM/TM (mediana 11, media 13). Ello es reflejo de su rango de variación observado [R=17 (TM/0) y R=7 (TM/TM)], consecuencia de que en el grupo TM/0 el 25 % de los pacientes (dos) tiene un puntaje de severidad clínica moderado (Q3=21,50). Es evidente también un solapamiento de esta variable entre ambos grupos genotípicos.

Llama la atención que de los ocho pacientes en el grupo TM/0, cinco son del sexo femenino, a pesar que en la serie analizada hay solamente seis hembras.

Tabla 20. Comportamiento de los parámetros bioquímicos (colesterol y 7DHC) según los genotipos TM/0 y TM/TM en 10 pacientes cubanos con SLO *

Genotipo	Variable	MI	MA	Q1	Q2	Q3	ME	DE	CV
TM/0	Colesterol (μmol/L)	1 160	2 057	1 260	1 910	2 510	1 890	600	0,32
	7DHC (μmol/L)	276	599	302,25	397	490	405,66	116,13	0,29
TM/TM	Colesterol (μmol/L)	1 240	2 830	1 420	2 020	2 640	2 030	650	0,32
	7DHC (μmol/L)	219	596	235	292,5	522,5	350	167,79	0,48

MI: mínimo valor, MA: máximo valor, Q1: percentil 25 %, Q2: mediana, Q3: percentil 75 %, ME: media, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

* Corresponde a los 10 pacientes de la investigación en los que se tiene conocimiento tanto de los parámetros bioquímicos como del genotipo DHCR7

Tabla 21. Comportamiento del puntaje de severidad clínica según genotipos TM/0 y TM/TM en 13 pacientes cubanos con SLO *

Genotipo	Puntaje de severidad clínica							
	MI	MA	Q1	Q2	Q3	ME	DE	CV
TM/0	11	28	17	18	21,5	18,88	4,88	0.26
TM/TM	10	17	10	11	11	13	3,67	0.28

MI: mínimo valor, MA: máximo valor, Q1: percentil 25 %, Q2: mediana, Q3: percentil 75 %, ME: media, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

* Corresponde a los 13 pacientes de la investigación en los que se conoce tanto el puntaje de severidad clínica como el genotipo DHCR7

4.4.3.1.1. Paciente con genotipo TM/TM y holoprosencefalia (HPE)

Dentro de los enfermos evaluados en el grupo genotípico TM/TM se incluye la paciente n.º 10, que es heterocigota compuesta para las mutaciones T93M y D234Y, tiene cifras relativamente altas de colesterol y bajas de 7DHC y un fenotipo ligero de SLO (puntaje de severidad clínica de 10) (anexo 11) y es la única entre los pacientes de esta investigación que manifiesta una característica craneofacial atípica del SLO: un incisivo central único que representa con una microforma de HPE.

4.4.3.2. Correlación del fenotipo clínico y el genotipo DHCR7 idéntico

En esta investigación se encontraron dos grupos de pacientes con idéntico genotipo DHCR7. Uno de ellos está compuesto por ocho heterocigotos compuestos para T93M y IVS8-1G>C, que corresponden a todos los del grupo TM/0 y el otro grupo lo integran dos enfermos homocigotos para T93M.

Como se explicó en el acápite 4.4.3.1, los pacientes con genotipo T93M/IVS8-1G>C tienen puntajes de severidad clínica que oscilan entre 11 y 28, con solo dos pacientes con valor por encima de 20 (fenotipo moderado). Estas diferencias en el puntaje son reflejo de las variaciones anatómicas entre dichos enfermos.

Los dos pacientes con fenotipo T93M/T93M tienen puntajes de 17 y 10, que corresponden con una severidad clínica ligera. Además de las diferencias anatómicas entre ellos el primero tiene un cuadro clínico clásico también en aspectos conductuales, del desarrollo pondoestatural y del dismorfismo facial, mientras que son muy sutiles en el segundo.

4.5. Discusión

4.5.1. Correlación entre los fenotipos bioquímico y clínico

Los valores medios de colesterol y 7DHC en los pacientes de este estudio son superiores a la media en una muestra de 142 pacientes provenientes de varias publicaciones científicas ^(45,49,54,76,82,234) (anexo 19). Como se puede apreciar también los valores de ambos metabolitos en los enfermos publicados experimentan un rango mucho más amplio de variación respecto a los cubanos, lo que podría explicarse por ser una muestra mayor en número y heterogeneidad. Por otra parte, el valor del coeficiente de correlación lineal de Pearson entre estos parámetros, 7DHC y colesterol, ($r=-0,123$; $p=0,14$), aporta

elementos a favor de la existencia de un patrón de asociación lineal inversa entre estas variables (anexo 20), resultado similar al obtenido en la presente investigación.

En cuanto a la relación entre los parámetros bioquímicos colesterol y 7DHC y la severidad clínica de la enfermedad los resultados obtenidos en diversas investigaciones son controversiales.

Neklason y cols. estudiaron la cinética enzimática de la 7DHCR en fibroblastos de tres pacientes, que mostró que la capacidad de las células para convertir el 7DHC en colesterol fue inversamente proporcional a la severidad clínica de la enfermedad ⁽²³⁵⁾.

En un estudio de 32 pacientes, Yu y cols. encontraron que el puntaje de severidad clínica se correlacionaba de forma inversa y lineal tanto con los valores absolutos de colesterol como con los valores relativos al total de esteroides. Esa misma investigación reveló una correlación positiva, aunque no significativa desde el punto de vista estadístico, con los niveles en plasma del 7DHC. Una evaluación más particularizada de los casos revela variaciones evidentes de los parámetros bioquímicos analizados en pacientes incluidos en el mismo grupo de severidad clínica ⁽²³⁶⁾.

Cunniff y cols. en un análisis de 80 pacientes observaron una correlación inversa entre la severidad clínica y los niveles de colesterol. En cambio, hallaron poca relación entre los niveles de 7DHC y la gravedad del fenotipo clínico e hizo notar que algunos pacientes más afectados clínicamente tenían cifras de 7DHC que aunque incrementadas eran relativamente bajas en comparación con otros pacientes con fenotipo clínico más ligero ⁽⁵⁹⁾.

Una investigación en pacientes franceses mostró una correlación inversa entre la colesterolemia y la gravedad clínica, a pesar de que pacientes con valores similares de colesterol se distribuían en los tres grupos de severidad. No se observó correlación entre la clínica y los valores de dehidrocolesteroides (7DHC+8DHC) ⁽⁵⁰⁾.

En 42 pacientes canadienses evaluados por Nowaczyk y cols. también se encontró una correlación inversa entre la severidad clínica y los niveles de colesterol ⁽⁵⁶⁾.

Tint y cols. en un estudio de 33 pacientes observaron valores más bajos de colesterol en pacientes con fenotipo más grave ⁽²³⁷⁾.

Waterham y Hennekam en el 2012 publicaron un metanálisis en el que mostraron que los fenotipos clínicos más severos se asociaban a valores más altos de 7DHC, pero la correlación era débil ⁽¹⁴⁾.

En cambio, Ryan y cols. en una investigación realizada por 49 pacientes británicos ⁽⁵¹⁾ no encontraron correlación entre los niveles de colesterol y 7DHC y la severidad clínica de la enfermedad.

En un análisis de la serie de 37 pacientes polacos publicados por Ciara y cols. ⁽⁵³⁾ se aprecia que el paciente con mayor severidad clínica (puntaje de 72) tiene una de las más elevadas cifras de colesterol y de 7DHC (situación similar a la encontrada en el paciente cubano n.º 4). Además ese valor de colesterol es más alto que el de los dos pacientes con menor severidad clínica (puntaje de 5). Además, pacientes con igual severidad clínica tienen diferencias notables en relación a estos dos parámetros bioquímicos.

4.5.2. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7

4.5.2.1. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7 según grupo genotípico

De manera similar a lo observado en los pacientes cubanos, un análisis de 66 enfermos provenientes de diferentes publicaciones con genotipos incluidos en los grupos T/0 y TM/TM (anexo 21) muestra que en el grupo de 16 pacientes con genotipo TM/TM los niveles medios de colesterol (mediana 2 307,41; media 2 209,62) fueron superiores respecto al grupo de 50 con el genotipo TM/0 (mediana 998,19; media 1 168,20). En cuanto al 7DHC los valores medios fueron más bajos (mediana 141, media 226,56) en el genotipo TM/TM cuando se comparan con los experimentados en el genotipo TM/0 (mediana 202,24; media 273,65). Ambos grupos genotípicos se caracterizan por la existencia de valores atípicos (coeficientes de variación superiores al 75%) para ambos parámetros bioquímicos (lo cual no se observa en los pacientes cubanos) y que pudieran relacionarse con la mayor heterogeneidad y tamaño de la muestra.

Lo teóricamente esperado es que los pacientes con mutaciones TM/M tengan valores más bajos de 7DHC y más altos de colesterol en comparación con los pacientes TM/0. Estudios de expresión de distintas mutaciones en cultivos de tejidos han mostrado que las mutaciones con sentido, dentro de las que se incluyen las TM, expresan cantidades normales de ARNm, pero la cuantía de proteína inmunorreactiva está reducida a causa de su inestabilidad, a pesar de lo cual se mantiene cierto grado de actividad enzimática (menor del 10 % en general y menos del 5 % en la mutación T93M). En cambio, las mutaciones

nulas originan una pérdida total de la actividad enzimática. De acuerdo a lo anterior, los valores de los metabolitos 7DHC y colesterol, deben relacionarse con la combinación de alelos (genotipo) ^(45,70,140). Tanto los resultados del presente estudio como los de la evaluación conjunta de casos publicados se corresponden con lo esperado.

4.5.2.2. Correlación entre el fenotipo bioquímico y el genotipo DHCR7 idéntico

Una comparación entre los pacientes cubanos con genotipo T93M/IVS8-1G>C y 14 publicados (anexo 22) refleja que en el primer grupo el valor medio de colesterol es casi el doble y el de 7DHC sensiblemente más alto y el coeficiente de variación para ambos metabolitos es mucho más bajo (de alrededor del 30%), lo que puede estar influido por la mayor diferencia en el fondo genético entre ambos grupos.

También en el anexo 22 se muestra el comportamiento experimentado por el colesterol y 7DHC en una muestra de seis pacientes con genotipo T93M/T93M referidos en la literatura. Los datos muestran que en el grupo de pacientes con el genotipo T93M/IVS8-1G>C los niveles medios de colesterol son notablemente más bajos y los de 7DHC más elevados cuando se comparan con los experimentados en el grupo que presenta el genotipo T93M/T93M. Estos resultados se corresponden con lo esperado de acuerdo al efecto sobre la actividad enzimática de las mutaciones que conforman el genotipo ^(45,53). La distribución de los dos metabolitos en ambos grupos genotípicos se caracteriza por la existencia de valores atípicos, cuestión que se refleja en coeficientes de variación superiores al 75%.

4.5.3. Correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo DHCR7

4.5.3.1. Correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo DHCR7 según grupo genotípico

Se plantea en la literatura que la correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo es difícil debido a la gran heterogeneidad alélica que ocasiona que la mayor parte de los pacientes sean heterocigotos compuestos. Es por esa razón que para facilitar el análisis se clasifiquen o agrupen los genotipos según la localización topológica de las mutaciones o de su impacto sobre el funcionamiento de la enzima ⁽⁴⁵⁾.

Con el propósito de evaluar la correlación del fenotipo clínico en estos dos grupos genotípicos en una muestra más amplia, se realizó el análisis en 60 pacientes con genotipo TM/0 y 29 TM/TM provenientes de varias publicaciones científicas que fueron revisadas por Waterham y Hennekam ⁽¹⁴⁾. Como se aprecia en

el anexo 23 el comportamiento del puntaje de severidad clínica en el grupo de pacientes TM/0 se caracteriza por niveles medios levemente superiores (mediana 23,50; media 27,12) en relación a los TM/TM (mediana 20; media 25), resultado similar al obtenido en el presente trabajo. Si bien ambos grupos genotípicos tienen un fenotipo moderado, los valores medios del puntaje de severidad clínica no distan mucho del límite superior considerado para el fenotipo ligero.

Es interesante la observación de que tanto entre los pacientes TM/0 como en los TM/TM hay algunos con un puntaje de severidad clínica entre los más bajos reportados y otros cuyos valores corresponden a un fenotipo clínico severo, lo cual no se encontró entre los pacientes cubanos.

El hallazgo de que entre los pacientes de esta investigación cinco de los ocho con genotipo TM/0 son hembras a pesar de que en general hay solamente seis de ese género puede ser consecuencia del azar, pero también puede ser un reflejo de que los genotipos TM/0 se relacionan no solamente con una mayor severidad clínica en el aspecto macro-anatómico sino también con la aparición de rasgos dismórficos más típicos de la enfermedad que facilitan su diagnóstico en el sexo femenino, que como se refirió en el capítulo 3 está subrepresentado en este y otros estudios.

4.5.3.1.1. Paciente con genotipo TM/TM y holoprosencefalia (HPE)

La HPE es un defecto de segmentación del cerebro anterior poco frecuente en el SLO (aproximadamente 5%)⁽⁴⁸⁾. En la literatura se reporta solamente un caso con incisivo central único, que es el paciente n.º 29 de Ciara y cols.⁽⁵³⁾ que tiene un fenotipo clínico moderado (puntaje de severidad de 35), con niveles de colesterol y 7DHC muy similares a los del paciente cubano (el primer metabolito por encima y el segundo por debajo de la media de los casos publicados (anexo 19) y que también es heterocigoto compuesto para dos mutaciones TM (L157P y V326L).

Los restantes casos publicados con SLO y HPE tienen formas clásicas y son homocigotos o heterocigotos compuestos para mutaciones nulas^(59,191,192,238-240).

La ocurrencia de HPE en el SLO se relaciona con la participación del colesterol en el autoprocésamiento de la proteína Shh y en otros eventos de la cascada de señalización embriológica como se explicó en el

acápite 1.6.1, por lo que se espera que los bajos niveles de colesterol característicos del SLO interfieran en estos procesos ⁽²⁴¹⁾. Sin embargo, la deficiencia de la síntesis del colesterol por sí sola no explica la aparición de las manifestaciones de HPE, pues la mayoría de los pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos para mutaciones nulas (que abolen la actividad enzimática) no tienen signos de HPE a pesar de tener un fenotipo clínico severo. Por otro lado, tanto el paciente del presente estudio como el referido por Ciara y cols. son heterocigotos compuestos para mutaciones TM, que conservan cierto grado de funcionamiento enzimático y se asocian a fenotipos clínicos más leves ⁽⁴⁵⁾.

Un estudio en 228 pacientes con HPE demostró que 22 (9,6 %) tenían alteraciones en la biosíntesis del colesterol, uno de ellos SLO y los otros, además de los bajos niveles de colesterol, mostraban un patrón anormal de esteroides (diferente al de los trastornos del metabolismo del colesterol previamente identificados). En este segundo grupo cinco tenían mutaciones en genes conocidos relacionados con la HPE, lo que sugirió que los trastornos de la biosíntesis del colesterol podían agravar las deficiencias en la cascada de señalización de Shh ⁽²⁴²⁾.

Shim y cols. realizaron una pesquisa de la mutación IVS8-1G>C y de otras posibles mutaciones en el exón nueve del gen DHCR7 (que codifica el dominio catalítico de la enzima y donde son muy frecuentes las mutaciones) en 36 fetos con HPE. Se encontraron 3 fetos heterocigotos para mutaciones con sentido, con un segundo alelo normal ⁽²⁴³⁾. Esto representa una frecuencia de heterocigotos de 8,3 %, aproximadamente tres veces mayor que la estimada en la población general ⁽³⁾.

En la HPE familiar no sindrómica autosómica dominante, frecuentemente asociada a mutaciones en el gen SHH, se observa una amplia variabilidad en la expresión y una penetrancia incompleta. Se plantea que probablemente distintas mutaciones en genes relacionados con la vía de señalización de Shh u otros implicados en la embriogénesis trabajen sinérgicamente con las mutaciones con sentido en SHH. Hay reportes de pacientes con mutaciones en genes SHH que también tienen mutaciones en otros genes (ZIC2, TGIF) y casos adicionales con mutaciones en dos genes diferentes a SHH. En ratones se ha encontrado que los doble heterocigotos tienen HPE, mientras que heterocigotos para una sola mutación no la tienen ⁽²⁴⁴⁾.

El caso de Weaver y cols. que es el de mayor severidad de HPE entre los pacientes con SLO reportados hasta el momento, fue estudiado para los otros cuatro genes más comúnmente asociados a HPE y no se encontraron mutaciones ^(192,245).

Además, existe una amplia lista de agentes teratógenos en los que se ha demostrado o hay sospechas de que son causantes de HPE ⁽²⁴⁶⁾. La acción de estos sobre fetos con otras deficiencias en la cascada de señalización de Shh puede favorecer la aparición de la HPE.

En el paciente de este estudio no se pudieron realizar investigaciones en otros genes vinculados con la HPE ni se tuvo conocimiento de la exposición prenatal a posibles teratógenos, pero la evaluación conjunta de su comportamiento clínico, bioquímico y molecular apoya la hipótesis de que otros factores genéticos y/o ambientales, además del genotipo DHCR7, están implicados en la variabilidad fenotípica del SLO y particularmente en la aparición de la HPE ⁽²⁴⁷⁾.

4.5.3.2. Correlación del fenotipo clínico y el genotipo DHCR7 idéntico

Además de los pacientes de esta investigación son 53 los publicados que tienen T93M en heterocigosis compuesta u homocigosis ^(45,53,54,74,76,78,212,233,234,236,248). Veintidós son heterocigotos compuestos para T93M y IVS8-1G>C. Se conoce el puntaje de severidad clínica en 15, de ellos siete tienen un fenotipo ligero, cinco moderado y tres severo. Siete casos publicados por Scalco y cols. ⁽²¹²⁾ no tienen calculado el puntaje de severidad pero son referidos como fenotipos clásicos. Si estos últimos se asumen como fenotipos ligeros o moderados puede plantearse que este es el modo de presentación de aproximadamente el 90 % de los pacientes con dicho genotipo, que fue lo observado en los pacientes cubanos.

De manera similar a los dos pacientes de esta investigación que son homocigotos para T93M, en los cinco de los siete enfermos reportados en la bibliografía con igual genotipo en los cuales se conoce el puntaje de severidad clínica, este es inferior a 20 ^(76,78,233,234).

No se encontraron referencias en la literatura de pacientes con los genotipos T93M/V281M, T93M/F302I y T93M/D234Y, pero el fenotipo ligero de esos tres pacientes se corresponde con lo observado en otras investigaciones para heterocigotos compuestos de mutaciones TM ^(49,53).

Además de las variaciones en cuanto a la severidad clínica entre los pacientes con igual genotipo DHCR7, medido a través del método de Kelley y Hennekam que se basa fundamentalmente en aspectos anatómicos, existen diferencias en otros aspectos como el intelecto, la conducta, el desarrollo pondoestatural, la alimentación, etc, que se observan en esta y otras investigaciones y que han sido notadas incluso entre hermanos ^(76,78).

4.5.4. Consideraciones acerca de la correlación entre el genotipo DHCR7 y los fenotipos bioquímico y clínico

Como se aprecia a partir del análisis realizado en los pacientes cubanos, el grupo genotípico TM/0 tiende a asociarse a mayores alteraciones en el metabolismo del colesterol y también a fenotipos clínicos más severos en comparación con el grupo genotípico TM/TM (a pesar de no existir significación estadística dado el pequeño tamaño de la muestra). Esta tendencia en el comportamiento general es la esperada atendiendo a que en los genotipos TM/TM ambos alelos mutados codifican una enzima con alguna actividad residual, lo cual sucede en un solo alelo en los genotipos TM/0, pues el segundo codifica para una enzima no funcional ^(45,70,140). Sin embargo, también se ha mostrado cómo entre ambos grupos genotípicos hay solapamiento en los niveles de los parámetros bioquímicos y la severidad clínica y a su vez dentro de cada uno de ellos hay diferencias en las variables analizadas, lo que también se observa entre quienes tienen idéntico genotipo DHCR7. Una situación similar se ha observado en otras investigaciones que han incluido una mayor diversidad de grupos genotípicos ^(45,46,53,236).

A continuación se considerarán algunos factores que pueden explicar las contradicciones encontradas en el análisis de la correlación fenotipo-genotipo en el SLO:

Primeramente, tal y como se reflejó en los acápite 1.6.1 y 4.5.3.1.1, la embriogénesis es un proceso muy complejo que requiere de una gran interacción génica y para la aparición de una malformación puede ser necesaria la presencia de más de un gen de susceptibilidad.

Por otra parte, el desarrollo fetal requiere de la síntesis endógena de colesterol y también del aporte materno, una muestra de ello es que en pacientes homocigotos para mutaciones nulas se detecta la presencia de este metabolito, aunque en cantidades disminuidas ^(45,53). Existen estudios que demuestran la

transferencia de colesterol materno al feto a través de la placenta y su importancia desde las primeras semanas de gestación. Esto pudiera explicar la observación de que fetos con síntesis endógena adecuada de colesterol pero con bajos niveles de esta sustancia en la madre tienen mayor riesgo de CIUR y microcefalia, mientras que la hipercolesterolemia materna favorece la aparición de acúmulos grasos en la aorta fetal ^(81,138). Como es lógico pensar, en los fetos incapaces de producir su propio colesterol el aporte materno adquiere mayor valor, por lo tanto los fenotipos bioquímico y clínico del SLO pueden estar modificados por variantes genéticas en el sistema de transporte de esteroides de la madre. Por esa razón, el estudio de los genes que puedan estar implicados en este proceso tiene gran significación tanto para la comprensión de la variabilidad en la expresión de la enfermedad como para futuras estrategias de tratamiento prenatal.

La apoE es un componente del sistema de transporte de colesterol en humanos, que se une a receptores en diferentes células. La isoforma apoE2 muestra disminución de la afinidad por los receptores LDL y tiene efecto sobre las concentraciones de colesterol. Witsch-Baumgartner y cols. realizaron una investigación en 137 pacientes de diferentes edades, sobre la relación de la isoforma de apoE con la gravedad de la enfermedad y encontraron correlación entre el puntaje de severidad clínica y el genotipo APOE materno, no así con el genotipo paterno ni del enfermo. El genotipo APOE2 materno en homocigosis o heterocigosis se asoció a los fenotipos clínicos más severos y más bajos niveles de colesterol. Igual correlación se mantuvo después de la estratificación de los pacientes según el genotipo DHCR7. Ese estudio concluyó que el transporte de colesterol de la madre al feto está afectado en el genotipo materno APOE2, lo que influye en el desarrollo embrionario. Variaciones genéticas en APOE de manera independiente no se han asociado a malformaciones en ratones ni en humanos. Sin embargo en casos de déficit de la síntesis endógena de colesterol como en el SLO, la apoE puede convertirse en un elemento esencial para el suministro de colesterol al feto. Una evidencia de ello es el incremento de ARNm para apoE durante el embarazo, lo cual ocurre en las vellosidades coriónicas y la placenta, además de ARNm para receptores conocidos que se unen a apoE en la placenta y las células neuroepiteliales. En dicho estudio los valores de colesterol se correlacionaron más en los grupos con igual genotipo APOE materno. Hasta el momento no

se tiene una explicación de cómo el colesterol postnatal se correlaciona con el genotipo APOE materno. En ese mismo estudio no se encontró asociación entre la severidad y las variantes de receptores LDL ⁽⁸⁰⁾.

Lanthaler y cols. investigaron sobre el posible efecto modificador del fenotipo en el SLO de cuatro genes involucrados en el metabolismo lipídico. Esos genes fueron: APOC3, LCAT (del inglés lecithin-cholesterol acyltransferase), CETP (del inglés cholesteryl-ester transfer protein) y ABCA1 (del inglés ATP-binding cassette transporter A1). Para los primeros tres genes no se encontró correlación con el fenotipo SLO, pero sí para este último. El gen ABCA1 está involucrado en el transporte de colesterol celular a través de las membranas hasta moléculas aceptoras como apoA1 y apoE en fluidos extracelulares. Este gen está altamente expresado en la placenta. Una variante alélica que causa una sustitución aminoacídica (R1587K) ocasiona bajos niveles de HDL-colesterol y elevados de LDL-colesterol en plasma, aumentando el riesgo de enfermedad coronaria en los homocigotos. Se encontró correlación entre este genotipo materno y una disminución de la severidad clínica en los hijos, no así con la concentración de colesterol, lo que indica que su modo de acción no está directamente relacionado con la influencia sobre los niveles de este metabolito. Se tiene la hipótesis de que quizás actúe como un regulador de la señalización intracelular ⁽²⁴⁹⁾.

En la vía de síntesis del colesterol intervienen múltiples enzimas ⁽¹⁵⁾, para cada una de ellas existen variantes genéticas que le confieren diferencias en su actividad y que en su conjunto ocasionan un mayor o menor rango de síntesis, por lo que la cantidad de 7DHC puede estar influida también por esas variaciones y no solamente por la dificultad de su conversión en colesterol. Además, ciertas enzimas que intervienen en la síntesis del colesterol tienen gran homología con la 7DHCR por lo que teóricamente es posible que algunas de ellas puedan reducir el enlace C7-C8 y producir colesterol en bajas cantidades ⁽²⁵⁰⁾. Asimismo, el 7DHC se transforma en 8DHC por la acción de una isomerasa ⁽⁴⁾, que también puede tener variantes genéticas que modifiquen las concentraciones del primer metabolito. En este sentido, cuando se analizan en los pacientes publicados los valores de 7DHC y 8DHC, estos últimos como tendencia son cercanos a los del 7DHC, sin embargo en otros se aprecian diferencias notables ⁽⁵³⁾.

Es probable también que existan variaciones en la capacidad de conversión del 7DHC en oxisteroles, esteroides neuroactivos y neuroesteroides anormales y posteriormente en la capacidad de degradación de los mismos, lo cual puede contribuir en la aparición o gravedad de diversos signos clínicos ^(2,4,250).

Otros factores con posible efecto en el comportamiento entre los parámetros bioquímicos, la severidad clínica y el genotipo DHCR7 son los relacionados con la alimentación. Los pacientes diagnosticados a más edad y que por cuestiones culturales reciben dietas con mayor contenido de colesterol pueden mostrar mayores niveles de ese metabolito y menores de 7DHC. Hay estudios que demuestran ese efecto de la dieta rica en colesterol y que se atribuye a la inhibición de la vía de síntesis mediado por la HMG-CoA reductasa ^(19,69,251). No obstante, se ha visto que en otros pacientes con similar alimentación no se logra la reducción directa del 7DHC, sino que lo que se obtiene es la mejoría de la proporción de colesterol en relación al total de esteroides. La razón por la cual hay un comportamiento desigual de los parámetros bioquímicos por la acción de la dieta no se conoce ^(3,250).

En párrafos anteriores se hizo referencia al paso placentario de colesterol, de modo que la cultura alimentaria materna, además de sus características metabólicas, pueden actuar sobre su propia concentración de colesterol y el aporte al feto, especialmente antes de la formación de la barrera hematoencefálica y de esa manera modificar la expresión fenotípica independientemente del genotipo DHCR7 ⁽²⁵⁰⁾.

Existen modelos animales de SLO derivados de la exposición prenatal a inhibidores de la 7DHCR ^(2,15), por lo que no puede descartarse la posibilidad de que la exposición materna a sustancias ambientales inhibidoras de la biosíntesis del colesterol agrave la deficiencia endógena fetal y repercuta en la expresión de los fenotipos bioquímico y clínico.

Como se ha visto hasta aquí, existen elementos teóricos para plantear que las contradicciones entre el genotipo DHCR7 y los fenotipos bioquímico y clínico evidenciadas en esta y otras investigaciones, reflejan que en el SLO al igual que en otras enfermedades monogénicas la expresión fenotípica resulta de una compleja interacción entre el efecto mayor de un gen con otros genes modificadores y el ambiente (anexo 24) ^(218,252).

4.6. Conclusiones del capítulo

A pesar del escaso número de pacientes estudiados los resultados sugieren que:

1. La severidad del fenotipo clínico del SLO tiene una correlación inversa con los valores de colesterol y directa con los de 7DHC.
2. Las mutaciones del tipo TM en homocigosis o heterocigosis compuesta, ocasionan un fenotipo bioquímico menos severo que cuando se encuentran en heterocigosis compuesta con mutaciones nulas.
3. Los genotípicos TM/TM y TM/0 se asocian a un fenotipo clínico de ligero a moderado, aunque más grave en el segundo grupo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

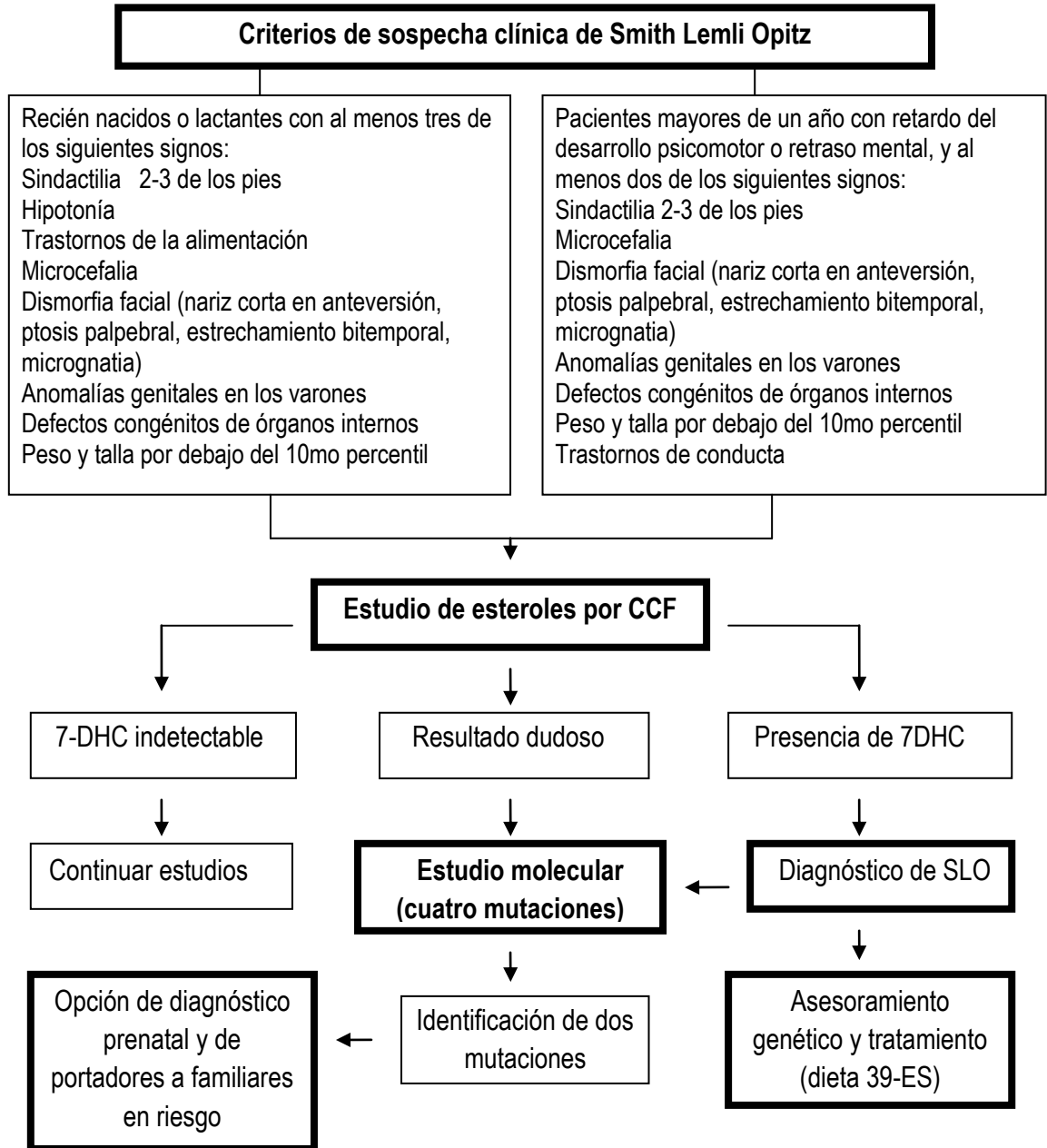
1. Las semejanzas encontradas entre las características clínicas de los pacientes cubanos con SLO respecto a las reportadas en otras series de casos de orígenes étnicos diferentes permiten afirmar que los criterios clínicos empleados para su pesquisa, tanto en las instituciones de atención a personas con discapacidad intelectual como en los servicios de Genética Clínica, son útiles para elevar la sospecha de la enfermedad, que de conjunto con el estudio del fenotipo bioquímico por CCF, representa una alternativa válida para el diagnóstico definitivo del SLO en Cuba.
2. El comportamiento de la frecuencia fenotípica por sexos, caracterizado por un notable predominio de varones y la presencia de malformaciones genitales en un alto porcentaje de ellos (atribuida al defecto de la síntesis de testosterona secundario al déficit de colesterol), permiten plantear que el SLO tiene una herencia influida por el sexo.
3. La alta frecuencia de la mutación T93M, con un posible efecto de fundador en Cuba, y el reconocimiento de la heterogeneidad genética en el locus DHCR7, así como la existencia de otra u otras variantes mutacionales aún no identificadas tiene implicaciones en futuras estrategias de caracterización molecular del SLO en el país.
4. Los resultados sugieren, a pesar del pequeño número de pacientes estudiados, que el genotipo DHCR7 determina en parte el comportamiento de los parámetros bioquímicos colesterol y 7DHC, el primero de los cuales se relaciona de forma inversa y el segundo de manera directa con la severidad del fenotipo clínico evaluado a través del puntaje de Kelley y Hennekam.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Estandarizar técnicas de estudio para otras mutaciones frecuentes en España y en el resto del mundo, usando la tecnología disponible en el CPGM-SS, con el propósito de mejorar la caracterización genética del SLO en el país y ampliar las posibilidades de acciones preventivas en las familias.
2. Proponer investigaciones a nivel comunitario dirigidas a la pesquisa clínica de la enfermedad en neonatos y lactantes que permitan un diagnóstico e intervención terapéutica y preventiva más temprana y un mayor acercamiento a la verdadera frecuencia fenotípica del SLO en Cuba, a partir del algoritmo presentado en esta investigación.

Algoritmo para el diagnóstico y asesoramiento genético del síndrome de Smith Lemli Opitz en Cuba



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). [cited 2014, may, 12]. Available from: <http://www.ncbi.nih.gov/omim/>
2. DeBarber AE, Eroglu Y, Merkens LS, Pappu AS, Steiner RD. Smith Lemli Opitz syndrome. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e24. doi:10.1017/S146239941100189X.
3. Porter FD. Smith Lemli Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:535-41.
4. Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol syntesis. *J Lipid Res.* 2011;52:6-34.
5. Smith DW, Lemli L, Opitz JM. A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr.* 1964;64(2):210-7.
6. Irons M, Elias ER, Salen G, Tint GS, Batta A. Defective cholesterol biosynthesis in Smith Lemli Opitz syndrome. *Lancet.* 1993;341:1414.
7. Tint GS, Irons M, Elias ER, Batta AK, Frieden R, Chen TS, Salen G. Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith Lemli Opitz syndrome. *N Engl J Med.* 1994;330:107-13.
8. Kelley RI, Kratz L. Cholesterol synthesis disorders. In: *Physician's guide to the diagnosis, treatment and follow-up of inherited metabolic diseases*; 2014. p. 585-600.
9. Waterham HR, Duran M. Diagnosis of inherited defects of cholesterol biosynthesis. In: Blau N, Duran M, Gibson KM. *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*; 2008. p. 483-95. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-540-76698-8_24#page-1

10. Moebius FF, Fitzky BU, Lee JN, Paik YK, Glossmann H. Molecular cloning and expression of the human delta7-sterol reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:1899-1902.
11. Fitzky BU, Witsch-Baumgartner M, Erdel M, Lee JN, Paik YK, Glossmann H, et al. Mutations in the Δ 7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:8181-6.
12. Wassiff CA, Maslen C, Kachilele-Linjewile S, Lin D, Linck LM, Connor WE, et al. Mutations in the human sterol Δ 7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Hum Genet*. 1998;63:55-62.
13. Waterham HR, Wijburg FA, Hennekam RC, Vreken P, Poll-The BT, Dorland L, et al. Smith Lemli Opitz syndrome is caused by mutations in the 7-dehydrocholesterol reductase gene. *Am J Hum Genet*. 1998;63:329-38.
14. Waterham HR, Hennekam RCM. Mutational spectrum of Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2012;160C(4):263-84.
15. Kelley RI, Hennekam R. The Smith Lemli Opitz syndrome. *J Med Genet*. 2000;37:321-35.
16. Nowaczyk MJM. Smith Lemli Opitz syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2014. [cited 2014, aug, 16]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1143/>
17. Svoboda MD, Christie JM, Yasemen-Eroglu Y, Freeman KA, Steiner RD. Treatment of Smith Lemli Opitz syndrome and other sterol disorders. *Am J Med Genet*. 2012;160C(4):285-94.
18. Nwokoro NA, Mulvihill JJ. Cholesterol and bile acid replacement therapy in children and adults with Smith Lemli Opitz (SLO/RSH) syndrome. *Am J Med Genet*. 1997;68:315-21.
19. Linck LM, Lin DS, Flavell D, Connor W, Steinert RD. Cholesterol supplementation with egg yolk increases plasma cholesterol and decreases plasma 7-dehydrocholesterol in Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2000;93:360-5.
20. Boctor FN, Wilkerson ML. Fresh frozen plasma as a source of cholesterol for newborn with Smith Lemli Opitz syndrome associated with defective cholesterol synthesis. *Ann Clin Laborat Sc*. 2014;44(3):332-3.

21. Lee HJ, Lee JH, Lee JS, Choe YH. The Smith Lemli Opitz syndrome with a G303R/R352W mutation: in an extremely irritable child responsive to cholesterol supplementation. *Genes & Genomics*. 2010;32:9-12.
22. Enjoji M, Yasutake K, Kohjima M, Nakamuta M. Nutrition and non-alcoholic fatty liver disease: the significance of cholesterol. *Int J Hepatol*. 2012;2012:925807.
23. Liu CJ. Prevalence and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease in Asian people who are not obese. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(10):1555-60.
24. Fukuda D, Aikawa E, Swirski FK, Novobrantseva TI, Kotelianski V, Gorgun CZ, et al. Notch ligand delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(27):E1868-77.
25. Goldenberg A, Wolf C, Chevy F, Benach A, Dumez Y, Munnich A, et al. Antenatal manifestations of Smith Lemli Opitz (RSH) syndrome: a retrospective survey of 30 cases. *Am J Med Genet*. 2004;124A:423-6.
26. Nowaczyk M, Martin D, Eng B, Waye J. Rapid molecular prenatal diagnosis of Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2001;102:387-8.
27. Waye JS, Eng B, Nowaczyk MJ. Prenatal diagnosis of Smith Lemli Opitz syndrome (SLOS) by DHCR7 mutation analysis. *Prenat Diagn*. 2007;27(7):638-40.
28. Aymé S. State of the art of services in Europe: where are the problems? *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5 Suppl 1:O2.
29. Barton D. Cross-border genetic testing. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5 Suppl 1:O19.
30. 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;96:791-2.
31. European Organisation for Rare Diseases (EURORDIS). What is a rare disease? [cited 2012, dec, 15]. Available from: <http://www.eurordis.org>
32. Hennekam R. Very rare disorders - organisation of care. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5 Suppl 1:O11.
33. Jovanovic M, Dequeker E, Desmet L, Morris M, Cassiman JJ, Aymé S. Genetic testing in Europe: transborder testing is a necessity. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5 Suppl 1:P4.

34. Simerka P. Council recommendation of 8 June 2009 on an action in the field of rare diseases. Official J Eur Union. 2009;C:151-7.
35. Le Henanff G, Tchernia G. French experience with rare diseases plans. Orphanet J Rare Dis. 2010;5 Suppl 1:O7.
36. Editorial. The needs of the few. Nature. 2010;466:160. [cited 2012, dec, 15]. Available from: <http://www.nature.com/nature/journal/v466/n7303/full/466160a.html>
37. Rodwell C, Aymé S. 2014 Report on the state of the art of rare disease activities in Europe: Part I – Overview of rare disease activities in Europe. [cited 2014, sept, 18]. Available from: <http://www.eucerd.eu/upload/file/Reports/2014ReportStateofArtRDActivities.pdf>
38. Rodwell C, Aymé S. 2014 Report on the state of the art of rare disease activities in Europe: Part II – Key developments in the field of rare diseases in Europe in 2013. [cited 2014, sept, 18]. Available from: <http://www.eucerd.eu/upload/file/Reports/2014ReportStateofArtRDActivitiesII.pdf>
39. Rodwell C, Aymé S. 2014 Report on the state of the art of rare disease activities in Europe – Part III: European Commission activities in the field of rare diseases. [cited 2014, sept, 18]. Available from: <http://www.eucerd.eu/upload/file/Reports/2014ReportStateofArtRDActivitiesIII.pdf>
40. Rodwell C, Aymé S. 2014 Report on the state of the art of rare disease activities in Europe – Part IV: European Medicines Agency activities and other European activities in the field of rare diseases. [cited 2014, sept, 18]. Available from: <http://www.eucerd.eu/upload/file/Reports/2014ReportStateofArtRDActivitiesIV.pdf>
41. Hamburg MA. Reauthorization of PDUFA: What it means for jobs, innovation and patients. [cited 2012, dec, 15]. Available from: <http://www.hhs.gov/asl/testify/2012/02/t20120201a.html>
42. Fund Rare Diseases and Orphan Drugs. Recommendations and proposed measures for the Belgian plan for rare diseases: phase I. Available from: http://www.kbs-frb.be/uploadedFiles/KBS-FRB/05%29_Pictures,_documents_and_external_sites/09%29_Publications/PUB_2025_BelgianPlanForRareDiseases_EN_02_DEF.pdf

43. Disease Registries in Europe. Orphanet Report Series. [cited 2012, dec, 15]. Available from: <http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Registries.pdf>
44. Borbolla-Vacher L, Yero-Bernal E, Dueñas-Gómez E, Mercado-Benítez AM. Síndrome de Smith Lemli Opitz. Presentación de dos casos. *Rev Cub Pediat*. 1974;46:53-66.
45. Witsch-Baumgartner M, Fitzky BU, Ogorelkova M, Kraft HG, Mobius FF, Glossmann H, et al. Mutational spectrum and genotype-phenotype correlation in 84 patients with Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Hum Genet*. 2000;66:402-12.
46. Witsch-Baumgartner M, Lanthaler B. Birthday of a syndrome: 50 years anniversary of Smith Lemli Opitz syndrome. *Eur J Human Genet advance*. 14 May 2014. doi:10.1038/ejhg.2014.87.
47. Opitz JM, Furtado LV. The RSH/"Smith Lemli Opitz" syndrome: Historical footnote. *Am J Med Genet*. 2012;160C(4):242-9.
48. Nowaczyk MJM, Irons M. Smith Lemli Opitz syndrome: phenotype, natural history and epidemiology. *Am J Med Genet*. 2012;160C(3). [cited 2012, oct, 15]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomonlinelibrary.wiley.com/whalecom0/doi/10.1002/ajmg.c.31346/full>.
49. Correa-Cerro LS, Wassif CA, Waye JS, Krakowiak PA, Cozma D, Dobson NR, et al. DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith Lemli Opitz syndrome. *J Med Genet*. 2005;42:350-7.
50. Goldenberg A, Chevy F, Bernard C, Wolf C, Cormier-Daire V. [Circunstancias clínicas para el diagnóstico del síndrome de Smith Lemli Opitz y tentativa de correlación fenotipo-genotipo: a propósito de 45 casos] When should Smith-Lemli-Opitz syndrome be considered? A serie of 45 cases. *Arch Pédiatr*. 2003;10:4-10.
51. Ryan AK, Bartlett K, Clayton P, Eaton S, Mills L, Donnai D, et al. Smith Lemli Opitz syndrome: a variable clinical and biochemical phenotype. *J Med Genet*. 1998;35:558-65.
52. Merkens MJ, Sinden NL, Brown CD, Merkens LS, Rouillet JB, Nguyen T, et al. Feeding impairments associated with plasma sterolsin Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Pediatr*. 2014. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.06.010>

53. Ciara E, Nowaczyk MJM, Witsch-Baumgartner M, Malunowicz E, Popowska E, Jezela-Stanek A, et al. DHCR7 mutations and genotype-phenotype correlation in 37 Polish patients with Smith Lemli Opitz syndrome. *Clin Genet*. 2004;66:517-24.
54. Krakowiak PA, Nwokoro NA, Wassif CA, Battaile KP, Nowaczyk MJM, Connor W, et al. Mutation analysis and description of sixteen RSH/Smith Lemli Opitz syndrome patients: polymerase chain reaction-based assay to simplify genotyping. *Am J Med Genet*. 2000;94:214-27.
55. Lee RWY, McGready J, Conley SK, Yanjanin NM, Nowaczyk MJM, Porter FD. Growth charts for individuals with Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2012. doi: 10.1002/ajmg.a.35376.
56. Nowaczyk MJM, Tan M, Hamid JS, Allanson JE. Objective assessment of facial phenotype. *Am J Med Genet*. 2012;158A:1020-8.
57. Jira P. Cholesterol metabolism deficiency. In: Dulac O, Lasseigne M, Sarnat HM editors. *Handbook of Clinical Neurology*. (3ers series) *Pediatric Neurology Part III*. Ed. Elsevier B.V; 2013. p. 1845-50. doi: 10.1016/B978-0-444-59565-2.00054-X.
58. Quélin C, Loget P, Verloes A, Bazin A, Bessières B, Laquerrière A, et al. Phenotypic spectrum of fetal Smith Lemli Opitz syndrome. *Eur J Med Genet*. 2012;55:81-90.
59. Cunniff C, Kratz L, Moser A, Natowicz M, Kelley R. Clinical and biochemical spectrum of patients with RSH/Smith Lemli Opitz syndrome and abnormal cholesterol metabolism. *Am J Med Genet*. 1997;68:263-9.
60. Poretti A, Boltshauser E, Doherty D. Cerebellar hypoplasia: Differential diagnosis and diagnostic approach. *Am J Med Genet*. 2014;166C(2):211-26.
61. Diaz-Stransky A, Tierney E. Cognitive and behavioral aspects of Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2012;160C(4):295-300.
62. Kanungo S, Soares N, He M, Steiner RD. Sterol metabolism disorders and neurodevelopment-an update. *Dev Disabil Res Rev*. 2013;17(3):197-210.
63. Bukelis I, Porter FD, Zimmerman AW, Tierney E. Smith Lemli Opitz syndrome and autism spectrum disorder. *Am J Psychiatry*. 2007;164(11):1655-61.

64. Sikora DM, Pettit-Kekel K, Penfield J, Merkens LS, Steiner RD. The near universal presence of autism spectrum disorders in children with Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet.* 2006;140A:1511-8.
65. Ghaziuddin M, Al-Owain M. Autism spectrum disorders and inborn errors of metabolism: an update. *Pediatr Neurol.* 2013;49(4):232-6.
66. Freeman KA, Eagle R, Merkens LS, Sikora D, Pettit-Kekel K, Nguyen-Driver M, et al. Challenging behavior in Smith Lemli Opitz syndrome: initial test of biobehavioral influences. *Cogn Behav Neurol.* 2013;26(1):23-9.
67. Schreiber JM, Lanham DC, Trescher WH, Sparks SE, Wassif CA, Caffo BS, et al. Variations in EEG discharges predict ADHD severity within individual Smith Lemli Opitz patients. *Neurology.* 2014;83(2):151-9.
68. Witsch-Baumgartner M, Sawyer H, Dorothea H. Clinical utility gene card for: Smith Lemli Opitz syndrome [SLOS]. *Eur J Hum Genet.* 2013;21. doi:10.1038/ejhg.2012.255.
69. Honda A, Tint GS, Salen G, Batta AK, Chen TS, Shefer S. Defective conversion of 7-dehydrocholesterol to cholesterol in cultured skin fibroblasts from Smith Lemli Opitz syndrome homozygotes. *J Lipid Res.* 1995;36:1595-1601.
70. Jira PE, Watherham HR, Wanders RJA, Smeitink JAM, Sengers RCA, Wevers RA. Smith Lemli Opitz syndrome and the DHCR7 gen. *Ann Hum Genet.* 2003;67:269-80.
71. Lanthaler B, Hinderhofer K, Maas B, Haas D, Sawyer H, Burton-Jones S, et al. Characterization of large deletions in the DHCR7 gene. *Clin Genet.* 2014 Jul 7. doi: 10.1111/cge.12454. [Epub ahead of print]
72. Waye JS, Nakamura LM, Eng B, Hunnisett L, Chitayat D, Costa T, Nowaczyk MJ. Smith Lemli Opitz syndrome: carrier frequency and spectrum of DHCR7 mutations in Canada. *J Med Genet.* 2002;39:e31.
73. Witsch-Baumgartner M, Ciara E, Loffler J, Menzel HJ, Seedorf U, et al. Frequency gradients of DHCR7 mutations in patients with Smith Lemli Opitz syndrome in Europe: evidence for different origins of common mutations. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:45-50.
74. 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 Mutat.* 2005;25(4):412. doi:10.1002/humu.9328

75. Balogh I, Koczok K, Szabó GP, Török O, Hadzsiev K, Csábi G, et al. Mutational spectrum of Smith Lemli Opitz syndrome patients in Hungary. *Mol Syndromol*. 2012;3:215-22.
76. Cardoso ML, Balreira A, Martins E, Nunes L, Cabral A, Marques M, 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.
77. Kolejáková K, Petrovič R, Futas J, Turčáni P, Ľurovčíková D, Chandoga J. Spectrum of DHCR7 mutations in Slovak patients with Smith Lemli Opitz syndrome and detection of common mutations by PCR-based assays. *Gen Physiol Biophys*. 2009;28(1):8-15.
78. Kalb S, Caglayan AO, Degerliyurt A, Schmida S, Ceylaner S, Hatipoglu N. High frequency of p.Thr93Met in Smith Lemli Opitz syndrome patients in Turkey. *Clin Genet*. 2012;81:598-601.
79. Nezarati MM, Loeffler J, Yoon G, MacLaren L, Fung E, Snyder G, et al. Novel mutation in the Δ -sterol reductase gene in three Lebanese sibs with Smith Lemli Opitz (RSH) syndrome. *Am J Med Genet*. 2002;110:103-8.
80. Witsch-Baumgartner M, Gruber M, Kraft HG, Rossi M, Clayton P, Giros M, et al. Maternal apo E genotype is a modifier of the Smith Lemli Opitz syndrome. *J Med Genet*. 2004;41(8):577-84.
81. Wollett LA. Review: Transport of maternal cholesterol to the fetal circulation. *Placenta*. 2011;1e4. doi:10.1016/j.placenta.2011.01.011.
82. Scalco FB, Otto PA, Brunetti IL, Cruzes VM, Moretti-Ferreira D. Smith Lemli Opitz syndrome: Clinical and biochemical findings in Brazilian. *Genet Molec Biol*. 2006;29(3):429-36.
83. Aquino-Perna AA, Martín-García D, Rodríguez-Carmona M. Diagnóstico del síndrome Smith Lemli Opitz por cromatografía de capa fina. *Rev Cub Genet Comunit*. 2012;6(2):47-9.
84. Langius FA, Waterham HR, Romeijn GJ, Oostheim W, de Barse MM, Dorland L, et al. Identification of three patients with a very mild form of Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2003;122A:24-9.
85. Guzzetta V, De Fabiani E, Galli G, Colombo C, Corso G, Lecora M, et al. Clinical and biochemical screening for Smith Lemli Opitz syndrome. *Acta Paediatr*. 1996;85:937-42.

86. Hall P, Michels V, Gavrilov D, Matern D, Oglesbee D, Raymond K, et al. Aripiprazole and trazodone cause elevations of 7-dehydrocholesterol in the absence of Smith Lemli Opitz syndrome. *Mol Genet Metab.* 2013;110(1-2):176-8.
87. Canfrán-Duque A, Casado ME, Pastor O, Sánchez-Wandelmer J, de la Peña G, Lerma M, et al. Atypical antipsychotics alter cholesterol and fatty acid metabolism in vitro. *J Lipid Res.* 2013;54:310-24.
88. VanVleet MWA. 50 years ago in the *Journal of Pediatrics*: A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr.* 2014;164(2):312.
89. Liss J, Lukaszuk K, Bruszczyńska A, Szczerkowska Z, Rebała K. Pregnancy and life after preimplantation genetic diagnosis of Smith Lemli Opitz syndrome. *Fertil Steril.* 2008;90(5):2011.
90. Shackleton CHL. Role of a disordered steroid metabolome in the elucidation of sterol and steroid biosynthesis. *Lipids.* 2012;47:1-12.
91. Lobo R, Zimmerman HH. Let's put it to the test: using maternal urine as a prenatal screen for Smith Lemli Opitz syndrome (SLOS). In: Heald B, Melvin A, Madeo AC, editors. Presented abstracts from the Thirty First Annual Education Conference of the National Society of Genetic Counselors. October 2012, Boston, United States. *Genet Counsel.* 2012;21:884-984.
92. Adam MP, Fechner PY, Ramsdell LA, Badaru A, Grady RE, Pagon RA, et al. Ambiguous genitalia: What prenatal genetic testing is practical? *Am J Med Genet.* 2012;158A(6):1337-43.
93. Dubuisson J, Guibaud L, Combourieu D, Massadier J, Raudrant D. [Aporte de la ecocardiografía fetal al diagnóstico prenatal del síndrome de Smith Lemli Opitz]. *Gynécol Obstétr Fertilité.* 2008;36:525-8.
94. Kazerouni N, Currier R J, Hodgkinson C, Goldman S, Lorey F, Roberson M. Ancillary benefits of prenatal maternal serum screening achieved in the California program. *Prenat Diagn.* 2010;30:981-7.
95. McPherson E, Thomas GD, Manlick C, Zaleski CA, Reynolds KK, Rasmussen K, et al. Extreme values of maternal serum analytes in second trimester screening: looking beyond trisomy and NTD's. *Genet Counsel.* 2011;20:396-403.
96. Hass D, Haegel G, Hoffmann GF, Burgard P. Prenatal presentation and diagnostic evaluation of suspected Smith Lemli Opitz (RSH) syndrome. *Am J Med Genet.* 2013; 161A(5):1008-11.

97. Martín-García D, Aquino-Perna A. Síndrome de Smith Lemli Opitz: consideraciones actuales para el asesoramiento genético. *Rev Cub Genét Comunit.* 2013;7(1):43-6.
98. Bzduch, V, Behulova D. Incidence of Smith Lemli Opitz syndrome in Slovakia. *Am J Med Genet.* 2000;90:260.
99. Al-Owain M, Imtiaz F, Shuaib T, Edrees A, Al-Amoudi M, Sakati N, et al. Smith Lemli Opitz syndrome among Arabs. *Clin Genet.* 2012;82(2):165-72.
100. Nowaczyk M, McCaughey D, Whelan D, Porter FD. Incidence of Smith Lemli Opitz syndrome in Ontario, Canada. *Am J Med Genet.* 2001;102:18-20.
101. Gedam R, Shah I, Ali U, Ohri A. Smith Lemli Opitz-syndrome. *Indian J Hum Genet.* 2012;18(2):235-7.
102. Tsukahara M, Fujisawa K, Yamamoto K, Hasui M, Saito C, Yamamaka T, et al. Smith Lemli Opitz syndrome in Japan. *Am J Med Genet.* 1998;75:118-9.
103. Ciara E, Popowska E, Piekutowska-Abramczuk D, Jurkiewicz D, Borucka-Mankiewicz M, Kowalski P, et al. SLOS carrier frequency in Poland as determined by screening of Trp151X and Val326Leu DHCR7 mutations. *Eur J Med Genet.* 2006;49:499-504.
104. Nowaczyk M, Nakamura LM, Eng B, Portes FD, Wayne J. Frequency and ethnic distribution of common DHCR7 mutations in Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet.* 2001;102:383-6.
105. Battaile KP, Battaile BC, Merkens LS, Maslen CL, Steiner RD. Carrier frequency of the common mutation IVS8-1G>C in DHCR7 and estimate of the expected incidence of Smith Lemli Opitz syndrome. *Molec Genet Metab.* 2001;72:67-71.
106. Loeffler J, Witsch-Baumgartner M, Menzel HJ, Kraft HG, Utermann G. Carrier frequencies of DHCR7 mutations in West-Austria indicate that Smith Lemli Opitz syndrome is among the most common autosomal recessive conditions. *Eur J Hum Genet.* 2001;9 Suppl 1:282.
107. Gelzo M, Dello Russo A, Corso G. Stability study of dehydrocholesterols in dried spot of blood from patients with Smith Lemli Opitz syndrome, using filter-paper 5 treated with butylated hydroxytoluene. *Clin Chim Acta.* 2012;413(3-4):525-6.

108. Lazarin GA, Haque IS, Nazareth S, Iori K, Patterson AS, Jacobson JL, et al. An empirical estimate of carrier frequencies for 400+ causal Mendelian variants: results from an ethnically diverse clinical sample of 23,453 individuals. *Genet Med*. 2013;15(3):178-86.
109. Cross JL, Iben J, Simpson CL, Thurm A, Swedo S, Tierney E, et al. Determination of the allelic frequency in Smith Lemli Opitz syndrome by analysis of massively parallel sequencing data sets. *Clin Genet*. 2014 May 9. doi: 10.1111/cge.12425. [Epub ahead of print]
110. Nowaczyk M, Whelan D, Hill R. Smith Lemli Opitz syndrome: phenotypic extreme with minimal clinical findings. *Am J Med Genet*. 1998;78:419-23.
111. Nowaczyk MJ, Waye JS, Douketis JD. DHCR7 mutation carrier rates and prevalence of the RSH/Smith Lemli Opitz syndrome: where are the patients? *Am J Med Genet*. 2006;140A(19):2057-62.
112. Jesela-Stanek A, Ciara E, Malunowicz E, Chrzanowskak K, Latos-Bielenska A, Krajewska-Walasek M. Differences between predicted and established diagnosis of Smith Lemli Opitz syndrome in the Polish population: underdiagnosis or loss of affected fetuses? *J Inher Metab Dis*. 2010;33 Suppl 3:S241-8.
113. Moog U, Zschocke J, Grünewald S. Physical abnormalities in metabolic diseases. In: Hoffmann GF, et al, editors. *Inherited metabolic diseases*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010. p.219-32.
114. Saita S, Shirane M, Ishitani T, Shimizu N, Nakayama KI. Role of the ANKMY2-FKBP38 axis in regulation of the Sonic Hedgehog (Shh) signaling pathway. *J Biol Chem*. Published online July 30, 2014. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M114.558635>
115. Cordero D, Tapadia M, Helms JA. Sonic Hedgehog signaling in craniofacial development. In: Ruiz i Altaba A, editor. *Hedgehog - Gli signaling in human disease*. Eureka.com and Springer Science+Business Media; 2006.p.153-76.
116. Bürglin TR. The Hedgehog protein family. *Genome Biology*. 2008;9(11):241. [cited 2014, oct, 8]. Available from: <http://genomebiology.com/2008/9/11/241>
117. D'Souza RN, Ruest LB, Hinton RJ, Svoboda KKH. Development of the craniofacial complex. In: Bone and development. Bronner F, Farach-Carson MC, Roach HI editors. Springer-Verlag London 2010. Available from: <http://link.springer.com/book/10.1007/978-1-84882-822-3>

118. Vaillant C, Monard M. SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum*. 2009;8:291-301.
119. Dyment DA, Sawyer SL, Chardon JW, Boycott KM. Recent advances in the genetic etiology of brain malformations. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013;13:364-74.
120. Phadke SR, Sankar VH. Polydactyly and genes. *Indian J Pediatr*. 2010;77:277-81.
121. Valdés-Valdés A, Pérez-Núñez HM, García-Rodríguez RE, López-Gutiérrez A. Sistema esquelético. En: *Embriología humana*. La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 2010. p. 87-102.
122. Anderson E, Peluso S, Lettice LA, Hill RE. Human limb abnormalities caused by disruption of hedgehog signaling. *Trends Genet*. 2012;28:364-73.
123. Lettice LA, Williamson I, Wiltshire JH, Peluso S, Devenney PS, Hill AE, et al. Opposing functions of the ETS factor family define Shh spatial expression in limb buds and underlie polydactyly. *Dev Cell*. 2012;22:459-67.
124. Regard JB, Mak KK, Gordon JA, Yang Y. Hedgehog signaling in growth plate and bone development. In: *Bone and Development*. Bronner F, Farach-Carson MC, Roach HI editors. Springer-Verlag London Limited 2010. p.65-80.
125. Chinnaiya K, Tickle C, Towers M. Sonic hedgehog-expressing cells in the developing limb measure time by an intrinsic cell cycle clock. *Nature Communicat*. 2014;5. [cited 2014, oct, 20]. Available from: <http://www.nature.com/ncomms/2014/140708/ncomms5230/full/ncomms5230.html>
126. Malik S. Syndactyly: phenotypes, genetics and current classification. *Eur J Hum Genet*. 2012;20:817-24.
127. Jordan D, Hindocha S, Dhital M, Saleh M, Khan W. The epidemiology, genetics and future management of syndactyly. *Open Orthop J*. 2012;6 Suppl 1:M2:14-27.
128. Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination-insights from humans and mice. *Chromosome Res*. 2012;20:215-38.
129. Valdés-Valdés A, Pérez-Núñez HM, García-Rodríguez RE, López-Gutiérrez A. Sistema urogenital. En: *Embriología humana*. La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 2010. p. 109-32.

130. van der Zanden LFM, van Rooij IALM, Feitz WFJ, Franke B, Knoers NVAM, Roeleveld M. Aetiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment. *Hum Reprod Update*. 2012;18(3):260-83.
131. Barbaro M, Wedell A, Nordenström A. Disorders of sex development. *Sem Fetal Neonat Medic*. 2011;16:119-27.
132. Rey R, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrin Metab*. 2011;25:221-38.
133. Wilhelm D, Yang JX, Thomas P. Mammalian sex determination and gonad development. In Paul Thomas, editor: *Current Topics in Developmental Biology*. Burlington: Ed. Academic Press; 2013. p. 89-121.
134. Jenkins D, Winyard PJD, Woolf AS. Immunohistochemical analysis of Sonic hedgehog signalling in normal human urinary tract development. *J Anat*. 2007;211:620-9.
135. Zhang M, Wang H, Teng H, Shi J, Zhang Y. Expression of SHH signaling pathway components in the developing human lung. *Histochem Cell Biol*. 2010;134:327-35.
136. Yang J, Chen J. Developmental programs of lung epithelial progenitors: a balanced progenitor model. *Developm Biol*. 2014;3(5):331-47.
137. Digilio MC, Dallapiccola B, Marino B. Atrioventricular canal defect as a sign of laterality defect in Ellis-van Creveld and polydactyly syndromes with ciliary and Hedgehog signaling dysfunction. *Pediatr Cardiol*. 2012;33:874-5.
138. Baardman ME, Kerstjens-Frederikse WS, Berger RMF, Bakker MK, Hofstra RMW, Plösch T. The role of maternal-fetal cholesterol transport in early fetal life: current insights. *Biol Reprod*. 2013;88(124). doi 10.1095/biolreprod.112.102442.
139. Cooper MK, Wassif CA, Krakowiak PA, Taipale J, Gong R, Kelley RI, et al. A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet*. 2003;33:508-13.
140. Kelley RI, Herman GE. Inborn error of sterol biosynthesis. *Ann Rev Genomics Hum Genet*. 2001;2:299-341.

141. Kelley RI, Hennekam RCM. Smith Lemli Opitz syndrome. In: The metabolic and molecular bases of inherited diseases. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.6183-6201.
142. Cordero D, Tapadia M, Helms JA. The role of Sonic Hedgehog signaling in craniofacial development. In: Fisher CE, Howie SEM, editors. Shh and Gli Signalling and Development. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media; 2006. p.44-57.
143. Koide T, Hayata T, Cho KW. Negative regulation of Hedgehog signaling by the cholesterologenic enzyme 7-dehydrocholesterol reductase. *Development*. 2006; 133:2395-2405.
144. Bianconi SE, Conley SK, Keil MF, Sinai N, Rother KI, Porter FD, et al. Adrenal function in Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2011;155A(11):2732-8.
145. Mellon SH. Neurosteroid regulation of CNS development. *Pharmacol Ther*. 2007;116(1):107-24.
146. Hirst JJ, Kelleher MA, Walker DW, Palliser HK. Neuroactive steroids in pregnancy: Key regulatory and protective roles in the foetal brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013 May 10. pii: S0960-0760(13)00063-0.
147. Sparks SE, Wassif CA, Goodwin H, Conley SK, Lanham DC, Kratz LE, et al. Decreased cerebral spinal fluid neurotransmitter levels in Smith Lemli Opitz syndrome. *J Inherit Metab Dis*. 2014;37:415-20.
148. Ogawa S, Kawamoto H, Mitsuma T, Fujimori H, Higashi T, Iida T. Stereoselective synthesis and NMR characterization of C-24 epimeric pairs of 24-alkyl oxysterols. *Lipids*. 2013;48:197-207.
149. Korade Z, Xu L, Mirnics K, Porter NA. Lipid biomarkers of oxidative stress in a genetic mouse model of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Inherit Metab Dis*. 2012 Jun 21. [cited 2012, nov, 25]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomlink.springer.com/whalecom0/article/10.1007%2Fs10545-012-9504-z>
150. Xu L, Korade Z, Porter NA. Oxysterols from free radical chain oxidation of 7-dehydrocholesterol: product and mechanistic studies. *J Am Chem Soc*. 2010;132(7): 2222-32.
151. Kamal MA, Raghunathan VA. Effect of ring-substituted oxysterols on the phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine membranes. *Eur Biophys J*. 2012;41:891-900.

152. Liu W, Xu L, Lamberson CR, Merkens LS, Steiner RD, Elias ER, et al. Assays of plasma dehydrocholesteryl esters and oxysterols from Smith Lemli Opitz syndrome patients. *J Lipid Res.* 2013;54(1):244-53.
153. Xu L, Korade Z, Rosado DA Jr, Liu W, Lamberson CR, Porter NA. An oxysterol biomarker for 7-dehydrocholesterol oxidation in cell/mouse models for Smith Lemli Opitz syndrome. *J Lipid Res.* 2011;52(6):1222-33.
154. Xu L, Sheflin LG, Porter NA, Fliesler SJ. 7-Dehydrocholesterol-derived oxysterols and retinal degeneration in a rat model of Smith Lemli Opitz syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(6):877-83.
155. Xu L, Korade Z, Rosado DA, Mirnics K, Porter NA. Metabolism of oxysterols derived from nonenzymatic oxidation of 7-dehydrocholesterol in cells. *J Lipid Res.* 2013;54(4):1135-43.
156. Korade Z, Xu L, Shelton R, Porter NA. Biological activities of 7-dehydrocholesterol-derived oxysterols: implications for Smith Lemli Opitz syndrome. *J Lipid Res.* 2010;51(11):3259-69.
157. Xu L, Liu W, Sheflin LG, Fliesler SJ, Porter NA. Novel oxysterols observed in tissues and fluids of AY9944-treated rats: a model for Smith Lemli Opitz syndrome. *J Lipid Res.* 2011;52(10):1810-20.
158. Meljon A, Watson GL, Wang Y, Shackleton CHL, Griffiths WJ. Analysis by liquid chromatography-mass spectrometry of sterols and oxysterols in brain of the newborn Dhcr7^{Δ3-5/T93M} mouse: A model of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(1):43-55.
159. Staneva G, Chachaty C, Wolf C, Quinn PJ. Comparison of the liquid-ordered bilayer phases containing cholesterol or 7-dehydrocholesterol in modeling the Smith Lemli Opitz syndrome. *J Lipid Res.* 2010;51:810-22.
160. Ren G, Jacob RF, Kaulin Y, Dimuzio P, Xie Y, Mason RP, et al. Alterations in membrane caveolae and BKCa channel activity in skin fibroblasts in Smith Lemli Opitz syndrome. *Mol Genet Metab.* 2011;104(3):346-55.
161. Haldar S, Kanaparathi RK, Samanta A, Chattopadhyay A. Differential effect of cholesterol and its biosynthetic precursors on membrane dipole potential. *Biophys J.* 2012;102(7):1561-9.

162. Korade Z, Kenworthy AK, Mirnics K. Molecular consequences of altered neuronal cholesterol biosynthesis. *J Neurosci Res.* 2009;87(4):866-75.
163. Liu Y, Chipot C, Shao X, Cai W. The effects of 7-dehydrocholesterol on the structural properties of membranes. *Phys Biol.* 2011;8(5):056005.
164. Orth M, Bellosta S. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol.* 2012. [cited 2012, oct, 17]. Available from: <http://hinari-gw.who.int/whalecomwww.ncbi.nlm.nih.gov/whalecom0/pmc/articles/PMC3483652/>
165. Ostroumova OS, Efimova SS, Schagina LV. Phloretin-induced reduction in dipole potential of sterol-containing bilayers. *J Membrane Biol.* 2013;246:985-91.
166. Chan YM, Merkens LS, Connor WE, Rouillet JB, Penfield JA, Jordan JM, et al. Effects of dietary cholesterol and simvastatin on cholesterol synthesis in Smith Lemli Opitz syndrome (SLOS). *Pediatr Res.* 2009;65:681-5.
167. Tierney E, Conley SK, Goodwin H, Porter FD. Analysis of short-term behavioral effects of dietary cholesterol supplementation in Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet.* 2010;152A:91-5.
168. Starck L, Lövgren-Sandblom A, Björkhem I. Cholesterol treatment forever? The first Scandinavian trial of cholesterol supplementation in the cholesterol-synthesis defect Smith Lemli Opitz syndrome. *J Int Medic.* 2002;252:314-21.
169. Sikora DM, Ruggero M, Petit-Kekel K, Merkens LS, Connor WE, Steiner RD. Cholesterol supplementation does not improve developmental progress in Smith Lemli Opitz syndrome. *J Pediatr.* 2004;144:783-91.
170. Szabó G, Oláh AV, Kozak L, Balogh E, Nagy A, Blahakova I, et al. A patient with Smith Lemli Opitz syndrome: novel mutation of the DHCR7 gene and effects of therapy with simvastatin and cholesterol supplement. *Eur J Pediatr.* 2010;169(1):121-3.
171. Korade Z, Xu L, Harrison FE, Ahsen R, Hart SE, Folkes OM, Mirnics K, et al. Antioxidant supplementation ameliorates molecular deficits in Smith Lemli Opitz syndrome. *Biol Psychiatry.* 2014;75(3):215-22.
172. Fliesler SJ. Antioxidants: The missing key to improved therapeutic intervention in Smith Lemli Opitz syndrome? *Hereditary Genet.* 2013;2(2):119-24.

173. Ying L, Matabosch X, Serra M, Watson B, Shackleton C, Watson G. Biochemical and physiological improvement in a mouse model of Smith Lemli Opitz syndrome (SLOS) following gene transfer with AAV vectors. *Mol Genet Metab Rep.* 2014;1:103-13.
174. Martín-García D, Aquino-Perna A, Rodríguez-Vázquez M. Síndrome de Smith Lemli Opitz. Reporte de caso. *Rev Cub Genét Hum.* 2001;3(1). ISSN: 1682-6760.
175. Martín-García D, Aquino-Perna A. Síndrome de Smith Lemli Opitz. *Rev Cub Genét Hum.* 2001;3(1). ISSN: 1682-6760.
176. Normas de Bioseguridad. Centro Provincial de Genética Médica de Sancti Spíritus; 2013.
177. Dueñas-Gómez E, Sánchez-TeXidó C, Santurio-Gil A. Patrones antropométricos en el recién nacido. La Habana: Ciencias Médicas;1990.
178. Jordán JR. Desarrollo humano en Cuba. La Habana: Ed. Científico-Técnica;1979.
179. Allanson JE, Cunniff C, Hoyme HE, McGaughran J, Muenke M, Neri G. Elements morphology: standard of terminology for the head and face. *Am J Med Genet.* 2009;149A:6-28.
180. Biesecker LG, Aase JM, Clericuzio C, Gurrieri F, Temple IK, Toriello H. Elements of morphology: standard terminology for the hands and feet. *Am J Med Genet.* 2009;149A:93-127.
181. Carey JC, Cohen MM Jr., Curry CJR, Devriendt K, Holmes LB, Verloes A. Elements of morphology: standard terminology for the lips, mouth and oral region. *Am J Med Genet.* 2009;149A:77-92.
182. Hall BD, Graham JM Jr., Cassidy SB, Opitz JM. Elements of morphology: standard terminology for the periorbital region. *Am J Med Genet.* 2009;149A:29-39.
183. Hennekam RCM, Cormier-Daire V, Hall J, Mehes K, Patton M, Stevenson R. Elements of morphology: standard terminology for the nose and philtrum. *Am J Med Genet.* 2009;149A:61-76.
184. Hunter A, Frias J, Gillessen-Kaesbach G, Hughes H, Jones K, Wilson L. Elements of morphology: standard terminology for the ear. *Am J Med Genet.* 2009;149A:40-60.
185. Hennekam RCM, Allanson JE, Biesecker LG, Carey JC, Opitz JM, Vilain E. Elements of morphology: standard terminology for the external genitalia. *Am J Med Genet* 2013;161A:1238-63.

186. Brown AY, Sawyer H, Greenslade M, Burton-Jones S, Murdoch-Davis C, Williams M, et al. Smith Lemli Opitz syndrome: the Bristol experience. In: Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Istanbul, Turkey, 31 August–3 September 2010. *J Inher Metab Dis.* 2010;33 Suppl 1:S1–S197.
187. Corso G, Gelzo M, Barone R, Clericuzio S, Pianese P, Nappi A, et al. Sterol profiles in plasma and erythrocyte membranes in patients with Smith Lemli Opitz syndrome: a six-year experience. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(12). doi 10.1515/CCLM.2011.689.
188. Jezela-Stanek A, Ciara E, Malunowicz EM, Korniszewski L, Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E. et al. Mild Smith Lemli Opitz syndrome: further delineation of 5 Polish cases and review of the literature. *Eur J Med Genet.* 2008;51:124-40.
189. Oxford Medical Databases. [cited 2014, May, 13]. Available from: <http://www.oup.co.uk>
190. Krajewska-Walasek M, Gradowska W, Ryżko J, Socha P, Chmielik J, Szaplyko W, et al. Further delineation of the classical Smith Lemli Opitz syndrome phenotype at different ages: clinical and biochemical studies. *Clin Dysmorph.* 1999;8:29-40.
191. Nowaczyk MJM, Farrell SA, Sirkin WL, Velsher L, Krakowiak PA, Waye JS, et al. Smith Lemli Opitz (RSH) syndrome: holoprosencephaly and homozygous IVS8-1G->C genotype. *Am J Med Genet.* 2001;103:75-80.
192. Weaver DD, Solomon BD, Akim-Samson K, Kelley RI, Muenke M. Cyclopia (synophthalmia) in Smith Lemli Opitz syndrome. First reported case and consideration of mechanism. *Am J Med Genet.* 2010;154C(1):142-5.
193. Nowaczyk MJM, Eng B, Waye JS, Farrell SA, Sirkin WL. Fetus with renal agenesis and Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet.* 2003;120A:305-7.
194. Pauli RM, Williams MS, Josephson KD, Tint GS. Smith Lemli Opitz syndrome thirty year follow-up of "S" of "RSH" syndrome. *Am J Med Genet.* 1997;68:260-2.
195. Nowaczyk M, Whelan D, Heshka T, Hill R. Smith Lemli Opitz syndrome: a treatable inherited error of metabolism causing mental retardation. *Canad Med Assoc.* 1999;161:165-70.

196. Ramírez-Gómara A, Castejón-Ponce E, Martínez-Martínez M, García-Bodega O, Rite-Gracia O, Segura-Arazuri D, et al. Síndrome de Smith Lemli Opitz tipo II de diagnóstico neonatal y revisión de sus conocimientos de mayor interés. *Rev Neurol*. 2002;34(10):946-50.
197. De la Torre-Verdú M, Vásquez-López M, Carrasco-Marina L, Girós ML, Quijano Roy S, Arregui-Sierra A. Síndrome de Smith Lemli Opitz. Anomalía en la síntesis del colesterol. *An Esp Pediatr*. 1997;46:617-20.
198. Mueller C, Patel S, Irons M, Antshel K, Salen G, Tint GS, et al. Normal cognition and behavior in a Smith Lemli Opitz syndrome patient who presented with Hirschsprung disease. *Am J Med Genet*. 2003;123A(1):100-6.
199. De Clemente V, Vitiello G, Imperati F, Romano A, Parente I, Rosa M, et al. Smith Lemli Opitz syndrome: a contribution to the delineation of a cognitive/behavioral phenotype. *Minerva Pediatr*. 2013;65(1):61-9.
200. Tierney E, Nwokoro N, Porter FD, Freund L, Ghuman JK, Kelly RI. Behavior phenotype in Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2001;98:191-200.
201. Prasad C, Marles S, Prasad A N, Nikkel S, Longstaffe S, Peabody D, et al. Smith Lemli Opitz syndrome: New mutation with a mild phenotype. *Am J Med Genet*. 2002;108:64-68.
202. Tierney E, Nwokoro NA, Kelley RI. Behavioral phenotype of RSH/Smith Lemli Opitz syndrome. *MRDD Research Reviews*. 2000;6:131-4.
203. Zarowski M, Vendrame M, Irons M, Kothare SV. Prevalence of sleep problems in Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 2011;155A:1558-62.
204. Weselake SV, Wevric R. Co-morbidity of complex genetic disorders and hypersomnias of central origin: lessons from the underlying neurobiology of wake and sleep. *Clinical Genet*. 2012;82(4):379-87.
205. Bauman ML. Medical comorbidities in autism: challenges to diagnosis and treatment. *Neurotherapeutics*. 2010;7:320-7.
206. Lee RWY, Tierney E. Hypothesis: the role of sterols in autism spectrum disorder. *Autism Res Treta*. 2011. [cited 2012, nov, 25]. Available from: <http://hinarigw.who.int/whalecomwww.ncbi.nlm.nih.gov/whalecom0/pmc/articles/PMC3420784/64>.

207. Tierney E, Bukelis I, Thompson RE, Ahmed K, Aneja A, Kratz L, et al. Abnormalities of cholesterol metabolism in autism spectrum disorders. *Am J Med Genet.* 2006;141B:666-8.
208. Carter MT, Scherer SW. Autism spectrum disorder in the genetics clinic: a review. *Clinical Genet.* 2013;83(5):399-407.
209. Shen J, Millar DT. Advances in genetic diagnosis of autism spectrum disorders. *Curr Pediatr Rep.* 2014;2:71-81.
210. Oh DH, Spivak G. Hereditary Photodermatoses. In: Ahmad SI, editor. *Diseases of DNA repair.* Landes Bioscience and Springer Science+Business Media; 2010. p. 95-105.
211. Witsch-Baumgartner M, Schwentner I, Gruber M, Berlain P, Bertranpetit J, Bierth E, et al. Age and origin of major Smith Lemli Opitz syndrome (SLOS) mutations in European Populations. *J Med Genet.* 2008;45(4):200-9.
212. Scalco FB, Correa-Cerro LS, Wassif CA, Porter FD, Moretti-Ferreira D. DHCR7 mutations in Brazilian Smith Lemli Opitz syndrome patients. *Am J Med Genet.* 2005;136A:278-81.
213. Oficina Nacional de Estadística e Información (ONEI). Accedido el 13 de mayo de 2014. Disponible en: <http://www.onei.cu>
214. Lantigua-Cruz A. Los genes en las poblaciones humanas. En: Bello-Alvarez D. editor. *Introducción a la Genética Médica.* 2da ed. La Habana: Ciencias Médicas; 2011. p.271-86.
215. Lardoeyt-Ferrer R. La Ley de Hardy Weinberg. En: *Fundamentos de Genética poblacional.* La Habana: Ciencias Médicas. De próxima aparición.
216. GeneBank. [cited 2014, may, 13]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000011.10?report=genbank&from=71434411&to=71448431&strand=true
217. Hamamy H. Consanguineous marriages. Preconception consultation in primary health care settings. *J Community Genet.* 2012;3:185-92.
218. Lantigua-Cruz A. Transmisión de simples mutaciones. En: Bello-Alvarez D. editor. *Introducción a la Genética Médica.* 2da ed. La Habana: Ciencias Médicas; 2011. p.143-64.

219. Lardoeyt-Ferrer R. Los polimorfismos genéticos como fuente de diversidad genética. En: Fundamentos de Genética poblacional. La Habana: Ciencias Médicas. De próxima aparición.
220. Barrios-García B. Ligamiento y recombinación. En: Bello-Alvarez D. editor. Introducción a la Genética Médica. 2da ed. La Habana: Ciencias Médicas; 2011. p.225-53.
221. Lardoeyt-Ferrer R. Desequilibrio de ligamiento: su relación con la Genética médica poblacional. En: Fundamentos de Genética poblacional. La Habana: Ciencias Médicas. De próxima aparición.
222. Lardoeyt-Ferrer R, Taboada-Lugo N. La consanguinidad y la endogamia. En: Fundamentos de Genética poblacional. La Habana: Ciencias Médicas. De próxima aparición.
223. Colectivo de autores. Por la vida. Estudio psicosocial de las personas con discapacidades y estudio psicopedagógico, social y clínico genético de las personas con retraso mental en Cuba. 2da ed. La Habana: Casa Editorial Abril; 2003. p. 148-57.
224. Alvarez G, Quinteiro C, Ceballos FC. Inbreeding and genetic disorder. In: Ikehara K. editor. Advances in the study of genetic disorders. Croatia: Published by InTech;2011. p 22-45. [cited 2014, oct, 12]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-the-study-of-genetic-disorders/inbreeding-andgenetic-disorder>
225. Shawky RM, Elsayed SM, Zaki ME, Nour El-Din SM, Kamal FM. Consanguinity and its relevance to clinical genetics. Egyptian J Medic Hum Genet. 2013;14:157-64.
226. Ceballos FC, Álvarez G. La genética de los matrimonios consanguíneos. Dendra Médica. Revista de Humanidades. 2011;10(2):160-76.
227. Marcheco-Teruel B, Parra EJ, Fuentes-Smith E, Salas A, Buttenschøn HN, Demontis D, et al. Cuba: Exploring the history of admixture and the genetic basis of pigmentation using autosomal and uniparental markers. PLoS Genet. 2014;10(7):e1004488.
228. Moreno-Estrada A, Gravel S, Zakharia F, McCauley JL, Byrnes JK, Gignoux CR, et al. Reconstructing the population genetic history of the Caribbean. PLoS Genet. 2013; 9(11):e1003925.

229. Galanter JM, Fernández-Lopez JC, Gignoux CR, Barnholtz-Sloan J, Fernández-Rozadilla C, Via M, et al. Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002554.
230. Lardoeyt-Ferrer R. La deriva genética. En: *Fundamentos de Genética poblacional*. La Habana: Ciencias Médicas. De próxima aparición.
231. Kozák L, Francová H, Hrabincová E, Procházková D, Jütterová V, Bzdúch V, et al. Smith Lemli Opitz syndrome: molecular-genetic analysis of ten familias. *J Inherit Metab Dis.* 2000;23:409-12.
232. Wright BS, Nwokoro NA, Wassif CA, Porter FD, Wayne JS, Eng B, et al. Carrier frequency of the RSH/Smith Lemli Opitz IVS8-1G>C mutation in African Americans. *Am J Med Genet.* 2003;120:139-41.
233. Nowaczyk M, Martín-García D, Aquino-Perna A, Rodríguez-Vázquez 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.
234. De Brasi D, Esposito T, Rossi M, Parenti G, Speradeo MP, Zuppaldi A, et al. Smith Lemli Opitz syndrome: evidence of T93M as a common mutation of delta7-sterol reductase in Italy and report of three novel mutations. *Eur J Hum Genet.* 1999;7(8):937-40.
235. Neklason DW, Andrews KM, Kelley RI, Matherall JE. Biochemical variants of Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet.* 1999;85:517-23.
236. Yu H, Lee MH, Starck L, Elias ER, Irons M, Salen G, et al. Spectrum of Δ 7-dehydrocholesterol reductase mutations in patients with the Smith Lemli Opitz (RSH) syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000;9(9):1385-91.
237. Tint GS, Salen G, Batta A, Shefer S, Irons M, Elias ER, et al. Correlation of severity and outcome with plasma sterol levels in variants of the Smith Lemli Opitz syndrome. *J Pediatr.* 1995;127(1):82-7.
238. Kratz L, Kelley, R. Prenatal diagnosis of the RSH/Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet.* 1999;82:376-81.
239. Kelley RI, Roessler E, Hennekam RCM, Feldman GL, Kosaki K, Jones MC, et al. Holoprosencephaly in RSH/Smith Lemli Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism affect the function of Sonic Hedgehog? *Am J Med Genet.* 1996;66:478-84.

240. Muenke M, Hennekam RCM, Kelley R. Holoprosencephaly as a manifestation of Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Hum Genet.* 1994;55:36A
241. Cohen MM Jr. Hedgehog signaling update. *Am J Med Genet.* 2010;152A:1875-1914.
242. Hass D, Morgenthaler J, Lacbawan E, Long B, Runz H, Garbade SF, et al. Abnormal sterol metabolism in holoprosencephaly: study in cultured lymphoblast. *J Med Genet.* 2007;44:298-305.
243. Shim YH, Bae SH, Kim JH, Kim KR, Kim CJ, Paik YK. A novel mutation of the human 7-dehydrocholesterol reductase gene reduces enzyme activity in patients with holoprosencephaly. *Bioch Biophys Res Commun.* 2004;315:219-23.
244. Cohen M: Holoprosencephaly: clinical, anatomic and molecular dimensions. *Birth Defects Res.* 2006;76A:658-73.
245. Pineda-Alvarez DE, Dubourg C, David V, Roessler E, Muenke M. Current recommendations for the molecular evaluation of newly diagnosed holoprosencephaly patients. *Am J Med Genet.* 2010;154C:93-101.
246. Cohen MM, Shiota K. Teratogenesis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet.* 2002;109(1):1-15.
247. Martín-García D, Aquino-Perna A, Rodríguez-Vázquez M. ¿Interacción génica como causa de holoprosencefalia en el síndrome de Smith-Lemli-Opitz? A propósito de un caso. *Rev Cub Genét Comunit.* 2013;7(1):43-6.
248. Patrono D, Dionisi-Vici C, Giannotti A, Bembi B, Digilio M, Rizzo C, et al. Two novel mutations of the human delta 7-sterol reductase DHCR7 gene in children with Smith Lemli Opitz syndrome. *Mol Cell Probes.* 2002;16:315-18.
249. Lanthaler B, Steichen-Gersdorf E, Kollerits B, Zschocke J, Witsch-Baumgartner M. Maternal ABCA1 genotype is associated with severity of Smith Lemli Opitz syndrome and with viability of patients homozygous for null mutations. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:286-93.
250. Yu H, Patel SB. Recent insights into the Smith Lemli Opitz syndrome. *Clin Genet.* 2005;68(5):383-91.
251. Pappu AS, Steiner RD, Connor SL, Flavell DP, Lin DS, Hatcher L, et al. Feedback inhibition of the cholesterol biosynthetic pathway in patients with Smith Lemli Opitz syndrome as demonstrated by urinary mevalonate excretion. *J Lipid Res.* 2002;43:1661-9.

252. Génin E, Feingold J, Clerget-Darpoux F. Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties. *Hum Genet.* 2008;124:357-68.
253. Nowaczyk MJM, Siu VM, Krakowiak PA, Porter FD. Adrenal insufficiency and hypertension in a newborn infant with Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet.* 2001;103(3):223–5.
254. Ko JS, Choi BS, Seo JK, Shin JY, Chae JH, Kang GH, et al. A novel DHCR7 mutation in a Smith Lemli Opitz syndrome infant presenting with neonatal cholestasis. *J Korean Med Sci.* 2010;25(1):159-62.
255. Arroyo-Carrera I. Síndrome de Smith Lemli Opitz. *Boletín de la ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología.* 2007;Serie V(6). [cited 2011, oct, 28]. Available from: http://bvs.isciii.es/mono/pdf/CIAC_06.pdf
256. Linck LM, Hayflick SJ, Lin DS, Battaile KP, Ginat S, Burlingame T, et al. Fetal demise with Smith Lemli Opitz confirmed by tissue sterol analysis and the absence of measurable 7-dehydrocholesterol reductase activity in chorionic villi. *Prenat Diagn.* 2000;20:238-40.
257. Katheria AC, Masliah E, Benirschke K, Jones KL, Kim JH. Idiopathic persistent pulmonary hypertension in an infant with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Fetal Pediatr Pathol.* 2010;29(6):373-9.
258. Haas D, Armbrust S, Haas JP, Zschocke J, Muhlmann K, Fusch C, et al. Smith Lemli Opitz syndrome with a classical phenotype, oesophageal achalasia and borderline plasma sterol concentrations. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28:1191-6.
259. Dogan KH, Atabek ME, Demirci S, Unver Dogan N. Smith Lemli Opitz syndrome: autopsy with new morphological findings. *J Pediatr Endocr Metab.* 2010;23:1105-6.
260. Koo G, Conley SK, Wassif CA, Porter FD. Discordant phenotype and sterol biochemistry in Smith Lemli Opitz syndrome. *Am J Med Genet.* 2010;152A:2094-8.
261. Patrono C, Rizzo C, Tessa A, Giannotti A, Borrelli P, Carrozzo R, et al. Novel 7-DHCR mutation in a child with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet.* 2000;91:138-40.
262. Chae JH, Kim KJ, Hwang YS, Ki CS, Kim JW. Identification of a novel DHCR7 mutation in a Korean patient with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Child Neurol.* 2007;22(11):1297-1300.

AUTOBIBLIOGRAFÍA

AUTOBIBLIOGRAFÍA

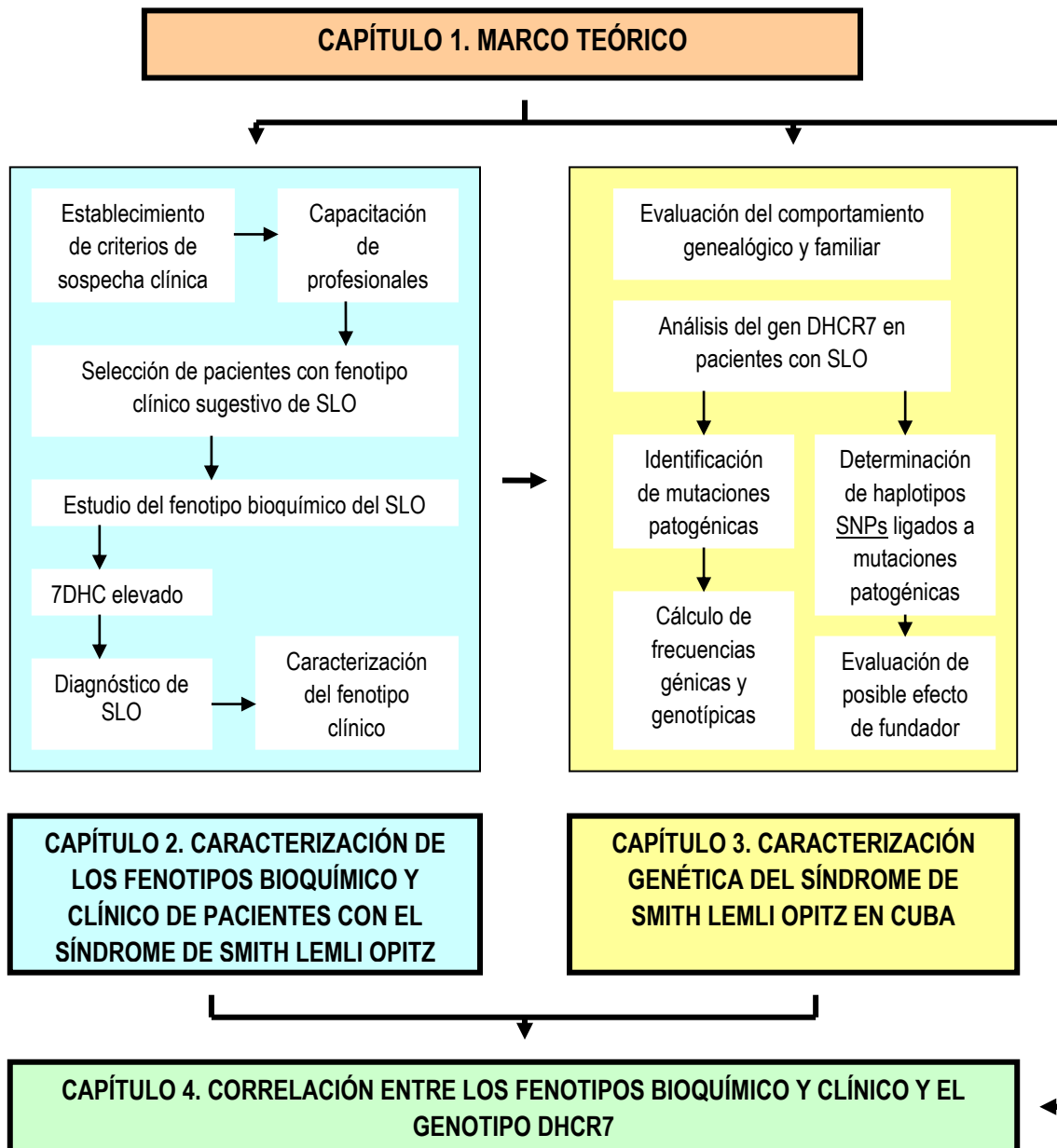
1. Martín-García D, Aquino-Perna A, Rodríguez-Vázquez M. Síndrome de Smith Lemli Opitz. Reporte de caso. Rev Cub Genét Hum. 2001;3(1). ISSN: 1682-6760.
2. Martín-García D, Aquino-Perna A. Síndrome de Smith Lemli Opitz. Rev Cub Genét Hum. 2001;3(1). ISSN: 1682-6760.
3. Nowaczyk M, Martin D, Eng B, Wayne J. Rapid molecular prenatal diagnosis of Smith Lemli Opitz syndrome. Am J Med Genet. 2001;102:387-8. Accedido el 13 de mayo de 2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11503169>
4. Nowaczyk M, Martín-García D, Aquino-Perna A, Rodríguez-Vázquez M, McCaughey D, Eng B, Nakamura M, Wayne J. Founder effect for the T93M DHCR7 mutation in Smith Lemli Opitz syndrome. Am J Med Genet. 2004;125A(2):173-6. Accedido el 13 de mayo de 2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14981719>
5. Aquino-Perna A, Martín-García D, Rodríguez-Carmona M. Diagnóstico del síndrome de Smith Lemli Opitz por cromatografía de capa fina. Rev Cub Genét Comunit. 2012;6(2):47-9. Accedido el 13 de mayo de 2014. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/rcgc/v6n2/090212.pdf>
6. Martín-García D, Aquino-Perna A, Rodríguez-Vázquez M. ¿Interacción génica como causa de holoprosencefalia en el síndrome de Smith-Lemli-Opitz? A propósito de un caso. Rev Cub Genét Comunit. 2013;7(1):43-6. Accedido el 13 de mayo de 2014. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/rcgc/v7n1/070113.pdf>
7. Martín-García D, Aquino-Perna A. Síndrome de Smith-Lemli-Opitz: consideraciones actuales para el asesoramiento genético. Rev Cub Genét Comunit. 2013;7(3):4-11. Accedido el 13 de mayo de 2014. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/rcgc/v7n3/010313.pdf>

8. Martín-García D, Aquino-Perna A, Rodríguez-Vázquez M, Peraza Cruz L. Caracterización clínica y genética del síndrome de Smith Lemli Opitz en Cuba para la atención médica integral. Concurso Premio Anual de la Salud 2012. Premio en la categoría de Investigación Aplicada. Accedido el 13 de mayo de 2014. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/libros/premio_anual_2012/2.pdf

ANEXOS

ANEXOS
INTRODUCCIÓN

Anexo 1. Flujograma de la investigación



Anexo 2. Consentimiento informado

Como Ud conoce en nuestro país se está desarrollando un programa encaminado el elevar la calidad de vida de los pacientes con discapacidades y/o enfermedades genéticas.

Como parte de ese programa el Centro de Genética Médica de Sancti Spiritus está trabajando en el análisis bioquímico y en la identificación de las mutaciones más frecuentes causantes del síndrome de Smith Lemli Opitz. Esta enfermedad es causada por una incapacidad del organismo para producir colesterol.

Con el propósito de confirmar o descartar la existencia de dicha enfermedad en el paciente, es necesario tomarle a él y a sus padres una muestra de sangre periférica. La cantidad de sangre que se extraerá no representa un peligro para la salud, además se utilizará material estéril y desechable con lo cual se evita el riesgo de infección. También será necesario obtener información acerca de los antecedentes de salud del enfermo, revisar su Historia Clínica, indicar estudios complementarios y tomar fotografías.

En caso de confirmarse el diagnóstico por medio de estos estudios se les brindará asesoramiento genético en el que se abordarán aspectos como: posibilidades de tratamiento, estimación del riesgo de otros hijos afectados, opciones de diagnóstico prenatal, etc. Además de las implicaciones prácticas que se derivan de este estudio, también podrán realizarse otras investigaciones básicas cuyos resultados contribuirían al conocimiento de la enfermedad y que a más largo plazo puedan derivar en beneficios para los pacientes.

La participación en el estudio es voluntaria y los profesionales de la salud que toman parte en el mismo se comprometen a que la información que se obtenga no se dará a terceras personas sin su consentimiento y a que los resultados alcanzados, así como las fotografías, serán presentados únicamente en medios científicos, donde no se harán referencias que permitan identificar a las personas participantes.

Si una vez leída y entendida la información que previamente le hemos ofrecido, Ud está de acuerdo en participar en la investigación le solicitamos que firme su consentimiento. Gracias.

Por este medio mostramos nuestra conformidad para participar en los estudios del síndrome de Smith Lemli Opitz.

Paciente: _____

Madre: _____

Nombre

Firma

Padre: _____

Nombre

Firma

Testigo: _____

Nombre

Firma

ANEXOS

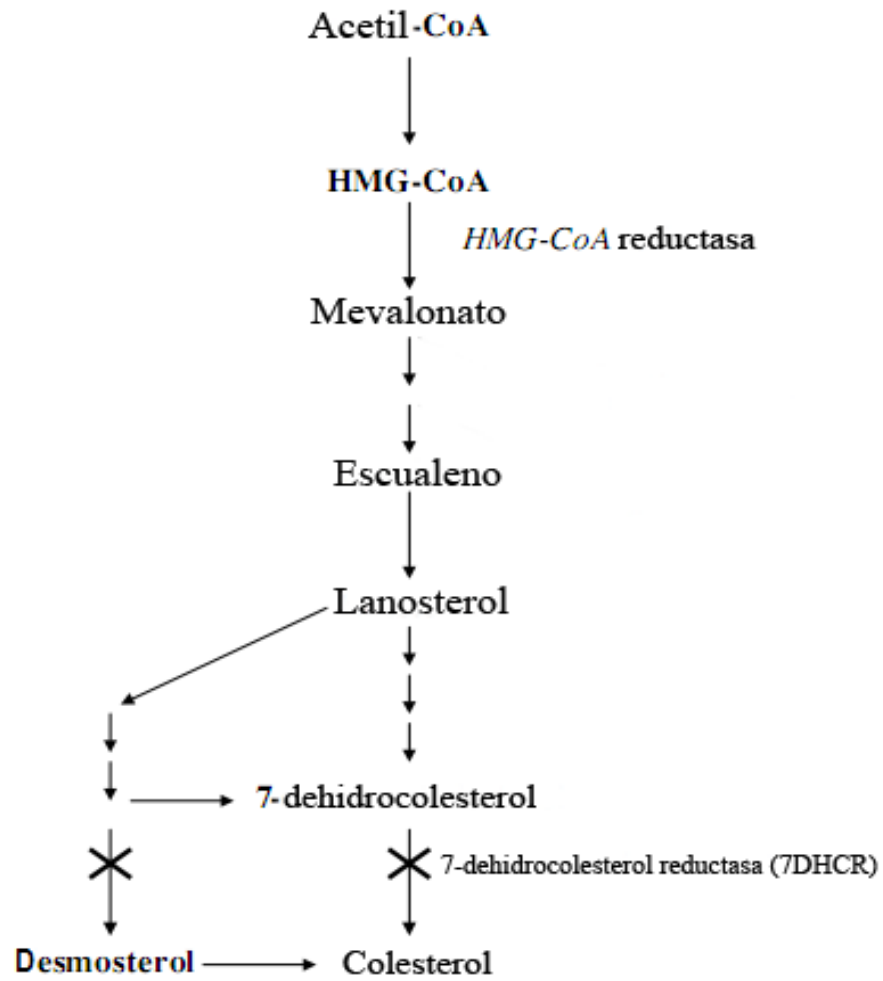
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

Anexo 3. Puntaje de severidad clínica de Kelley y Hennekam ⁽¹⁵⁾

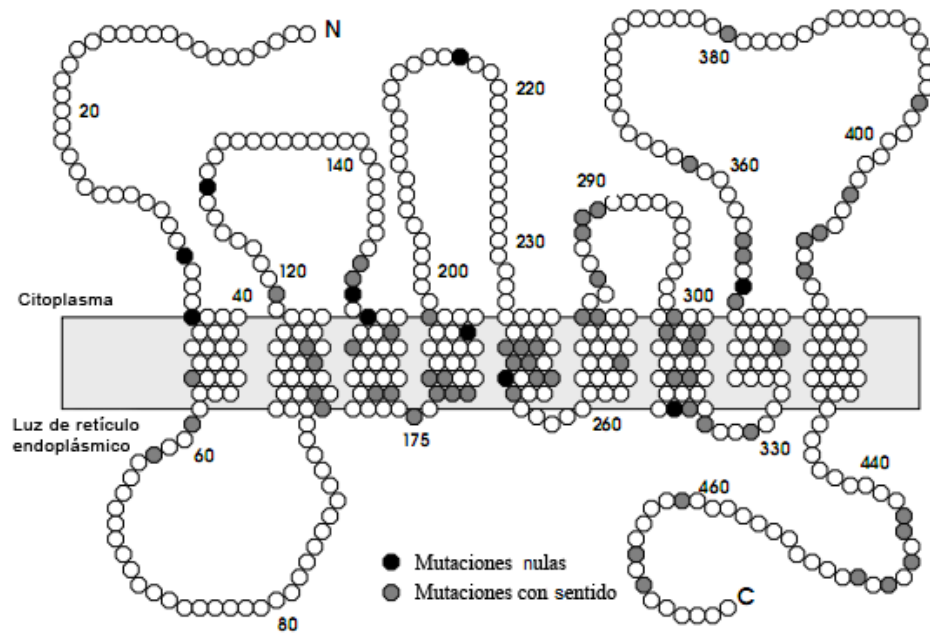
Órgano	Puntos	Criterio
Cerebro	1	Convulsiones, alteraciones cualitativas detectadas por resonancia magnética
	2	Malformaciones mayores del SNC, defectos girales
Boca	1	Úvula bífida, hendidura submucosa
	2	Hendidura del paladar duro o labio leporino medial
Extremidades	0	Sindactilia 2-3 pies mínima (no forma de Y)
	1	Sindactilia 2-3 en forma de Y, pie varo, polidactilia de manos o pies, otras sindactilias
	2	Dos de las anteriores
Ojos	2	Catarata, microftalmía franca
Corazón	0	Defectos funcionales
	1	Defectos aislados de cámaras o vasos
	2	Malformaciones cardíacas congénitas
Riñones	0	Defectos funcionales
	1	Quistes renales aislados
	2	Agenesia renal, quistes renales con repercusión clínica
Hígado	0	Enfermedad hepática inducida
	1	Alteración estructural simple
	2	Enfermedad hepática progresiva
Pulmones	1	Alteraciones en la lobulación, hipoplasia pulmonar
	2	Quistes pulmonares, otras malformaciones mayores
Intestino	0	Alteraciones funcionales gastrointestinales
	1	Estenosis pilórica
	2	Enfermedad de Hirschsprung
Genitales	1	Hipospadia
	2	Genitales ambiguos con cariotipo 46,XY, anomalías genitales francas con cariotipo 46,XX

Nota: Para la obtención del puntaje de severidad anatómica se requiere la evaluación de al menos cinco estructuras. Se suman los puntos correspondientes a cada estructura según la anomalía presente, luego se dividen entre el número de estructuras evaluadas y se multiplica por 100. Se considera que el fenotipo clínico es ligero cuando el puntaje es \leq a 20, moderado entre 21 y 50 y severo $>$ 50.

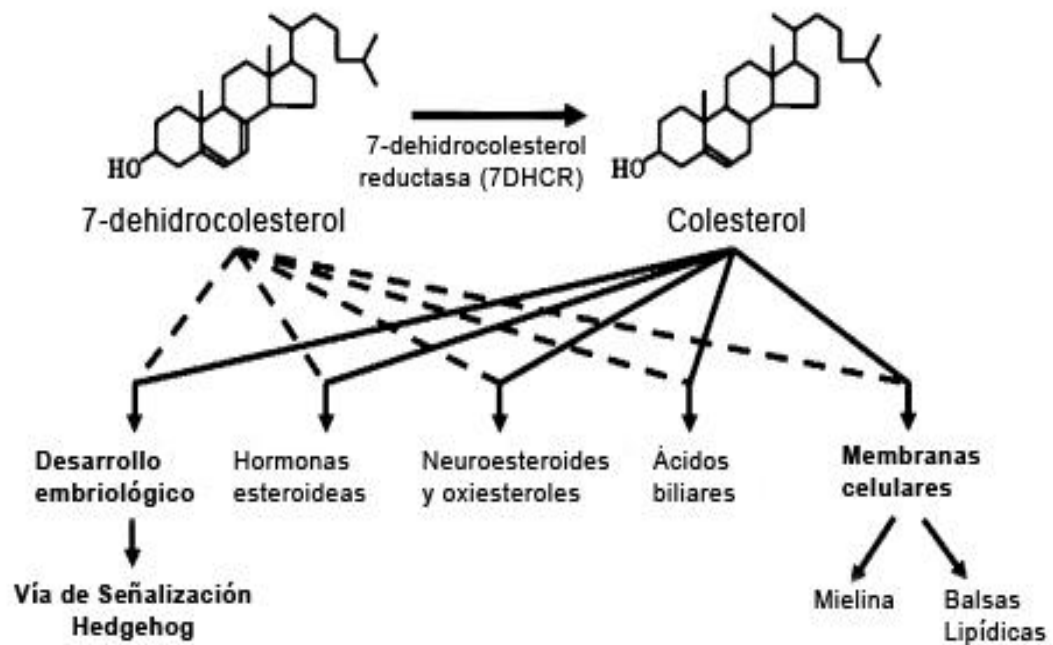
Anexo 4. Vía de síntesis del colesterol de Kandutsch-Russell ⁽⁷⁰⁾



Anexo 5. Representación esquemática de la enzima 7DHCR ⁽⁷⁰⁾



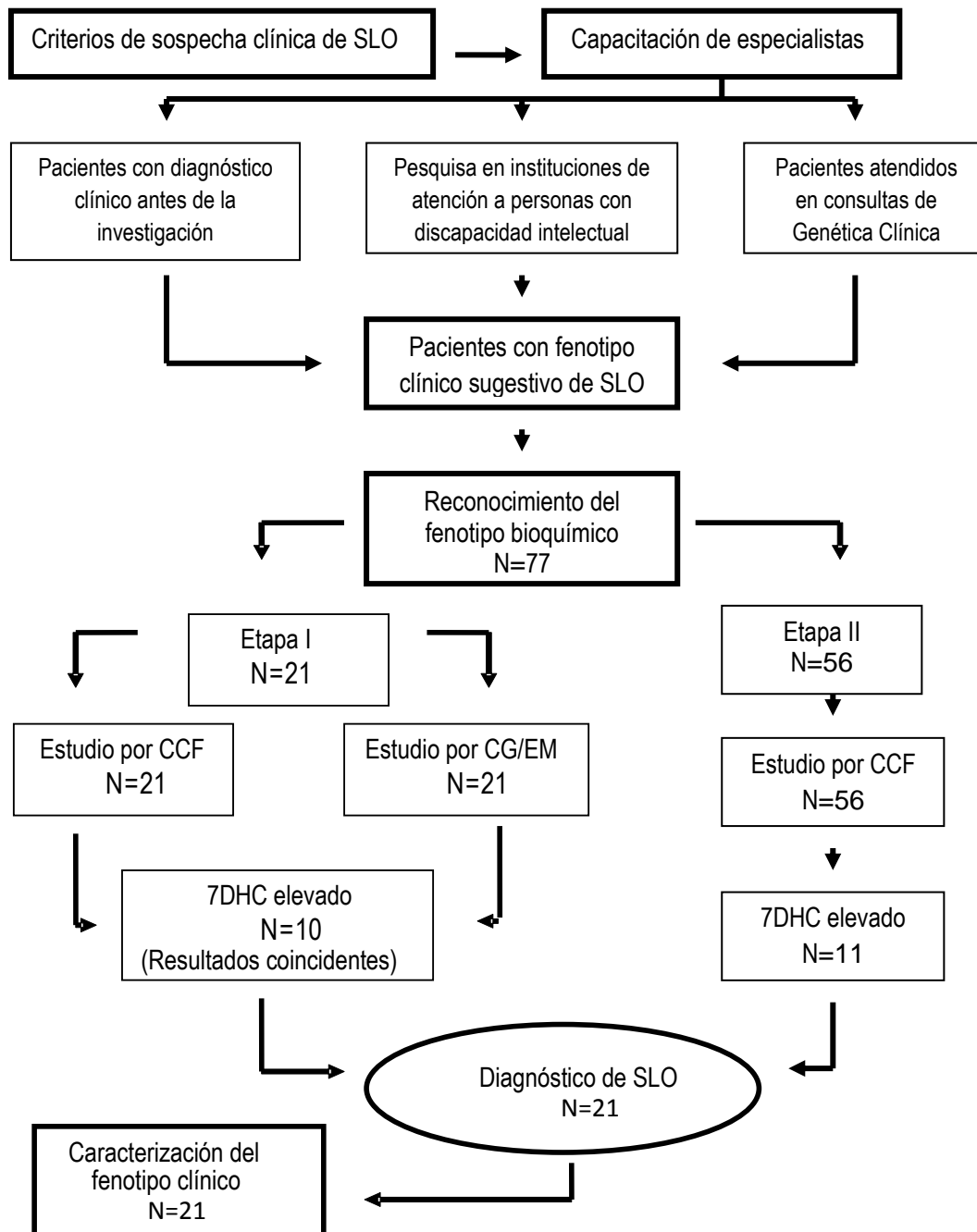
Anexo 6. Fisiopatología del SLO. Mutaciones en el gen que codifica la enzima 7-dehidrocolesterol reductasa (7DHCR) impiden la reducción del 7-dehidrocolesterol (7DHC) a colesterol en el paso final de la vía de síntesis del colesterol de Kandutsch-Russell; el colesterol tiene múltiples funciones biológicas que pueden ser alteradas por su carencia, por el efecto tóxico del 7DHC (o de metabolitos derivados de él) o de la combinación de estos dos factores ⁽³⁾



ANEXOS

CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS FENOTIPOS BIOQUÍMICO Y CLÍNICO DE PACIENTES CON EL SÍNDROME DE SMITH LEMLI OPITZ

Anexo 7. Flujoograma seguido para la caracterización de los fenotipos bioquímico y clínico de pacientes con SLO



Anexo 8. Instructivo para la toma de muestra para estudios bioquímicos y moleculares del síndrome de Smith Lemli Opitz

En niños grandes y adultos debe extraerse 10 mL de sangre, pero en pacientes con muy mal estado físico o niños muy pequeños podría tomarse 4-5 mL, según criterios clínicos. Usar siempre jeringuilla desechable y coleccionar la muestra en tubo con K₃EDTA, luego centrifugar y separar en un tubo Eppendorf el plasma (esto es lo que se emplea para el análisis bioquímico). El sedimento celular, con alguna cantidad de plasma, que queda luego de la centrifugación debe enviarse también para de ahí obtener el ADN en nuestro laboratorio. Si hay dificultades para la centrifugación puede enviarse la sangre total.

El plasma debe ser congelado y el sedimento celular puede conservarse a 4 °C si la demora en el envío de la muestra a Sancti Spíritus es menor de tres días, de lo contrario debe congelarse.

Se insiste en que deben enviarse ambas muestras ya que el estudio bioquímico precede al molecular y tiene mayor utilidad diagnóstica puesto que el segundo se restringe a cuatro mutaciones de las más de 150 identificadas.

Los tubos con sedimento celular y plasma deben ser bien identificadas con el nombre y dos apellidos del paciente y deben acompañarse de los modelos de indicación de estudio bioquímico y molecular de se utiliza en la Red Nacional de Genética, así como el Consentimiento informado y la Historia clínica diseñada para estos pacientes (no olvidar señalar el o los medicamentos que esté tomando en los días de la extracción de la muestra y hasta una semana antes).

Las muestras podrán ser enviadas directamente al Centro Provincial de Genética Médica de Sancti Spíritus o al Centro Nacional de Genética Médica. Comunicarnos inmediatamente el envío de la muestra al Centro Nacional para realizar las coordinaciones pertinentes para hacerla llegar a nuestro laboratorio.

Cualquier preocupación contactar a:

Dra. Diana Martín García

Tel. 0141- 336306, 326936 e.mail: dianamartin.ssp@infomed.sld.cu

Lic. Angel Aquino Perna

Tel. 0141- 320843 o 336304 e.mail: angel.aquino@infomed.sld.cu

Dr. Miguel Rodríguez Vázquez

Tel. 0141-328531 e.mail: geness@infomed.sld.cu

Anexo 9. Formulario para pacientes con fenotipo clínico sugestivo de Smith Lemli Opitz

Nombre _____ Fecha nacimiento _____

Dirección _____

Antecedentes familiares:

Consanguinidad parental: _____ SI _____ NO

Historia del nacimiento y periodo neonatal:

Peso _____ Talla _____ Circunf. Cefálica _____
____ Pobre succión _____ Dificultades para deglutir _____ Vómitos/reflujo
____ Alimentación por gavage _____ Sepsis _____ Hipotonía

Examen físico:

Peso _____ Peso/Edad _____ Talla _____ Talla/Edad _____
Peso/talla _____ CC _____ CC/Edad _____

Craneofacial:

____ Estrechamiento bitemporal _____ Ptosis palpebral
____ Puente nasal deprimido _____ Punta nasal ancha _____ Narinas en anteversión
____ Micrognatia _____ Hendidura palatina _____ Paladar alto y estrecho _____ Uvula bífida

Orejas: ____ de baja implantación _____ rotación posterior _____ grandes

Manos:

____ Polidactilia postaxial _____ Braquidactilia de uno o más dedos (especificar)
____ Clinodactilia (especificar) _____ Surco palmar transversal único
____ Acortamiento/implantación proximal del pulgar

Pies:

____ Sindactilia 2/3 _____ Polidactilia postaxial _____ Luxación/subluxación de cadera
____ Deformidades de pies (especificar)

Genitales:

____ Criptorquidia _____ Hipospadia _____ Pene pequeño _____ Escrotos pequeños
____ Escroto bífidos _____ Genitales ambiguos _____ Sexo reverso
____ Hipoplasia labios menores/mayores

Anomalías de órganos internos (especificar)

Función mental:

____ Retraso del desarrollo sicomotor

Retraso mental: ____ Leve ____ Moderado ____ Severo

Conducta:

____ Trastornos del sueño ____ Autolesión ____ Agresividad ____ Hiperactividad

____ Irritabilidad ____ Hipersensibilidad a ruidos ____ Hipersensibilidad a luz

____ Hipersensibilidad táctil en manos y/o pies ____ Fijación con objetos

____ Movimientos estereotipados (ej "aleteo" con las manos, balanceo, manipular un mechón de pelo o tela, aplaudir, girar y correr en círculo, etc)

____ Perseverancia de la uniformidad (realizar la misma actividad, de la misma forma, en el mismo orden, etc)

Otros problemas de salud:

Resultado del estudio de esteroides:

Anexo 10. Historia clínica para evaluación de pacientes con síndrome de Smith Lemli Opitz

Nombre _____

Fecha de nacimiento _____

Dirección _____ **Teléfono** _____

Nombre de la madre _____ **Edad** _____ **Color de piel** _____

Nombre del padre _____ **Edad** _____ **Color de piel** _____

1.- Árbol genealógico (no menos de tres generaciones). Señalar los antecedentes familiares, abortos, óbitos fetales.

2.- Historia del embarazo del propósito:

___ Amenaza de aborto ___ Disminución de movimientos fetales

___ Polihidramnios ___ Oligoamnios

___ Diagnóstico US de malformaciones congénitas (Especificar)

___ Otros (Especificar) _____

3.- Historia del nacimiento:

Edad gestacional _____ Presentación _____

Peso _____ Talla _____ CC _____ Apgar _____

4.- Morbilidad neonatal:

___ Pobre succión ___ Dificultades para deglutir ___ Vómitos/reflujo

___ Alimentación por gavage ___ Sepsis

___ Otras (especificar) _____

5.- Historia natural de la enfermedad (al dorso)

6.- Examen físico:

Peso _____ Peso/Edad _____ Talla _____ Talla/Edad _____

Peso/talla _____ CC _____ CC /Edad _____

Craneofacial:

___ Estrechamiento bitemporal ___ Frente alta ___ Hemangioma frontal

___ Metópica prominente ___ Occipucio prominente

Estrabismo Ptosis palpebral Cataratas Epicanto Hipertelorismo

Desviación hacia arriba o hacia abajo de las fisuras palpebrales (especificar)

Otras alteraciones oculares (especificar)

Puente nasal deprimido Punta nasal ancha Narinas en anteversión

Estrechamiento o atresia de coanas Filtrum largo

Micrognatia Hendidura palatina Hendidura palatina submucosa

Paladar alto y estrecho

Microglosia Hipercrecimiento del tejido sublingual Boca grande

Hipercrecimiento de arcos alveolares Rugosidad de arcos alveolares y/o paladar

Dientes grandes/espaciados Erupción prematura de los dientes

Malposición y/o maloclusión dentaria

Orejas: de baja implantación rotación posterior grandes

Cuello corto Exceso de piel en nuca Pelo claro

Otras (especificar)

Manos:

Polidactilia postaxial Braquidactilia de uno o más dedos (especificar) Clinodactilia (especificar)

Sindactilia (especificar) Aumento de pliegues interdigitales

Superposición de dedos Desviación ulnar de dedos

Surco palmar transversal único Eminencias tenares pequeñas

Acortamiento/implantación proximal del pulgar Acortamiento de miembros superiores (especificar)

Otras (especificar)

Pies:

Sindactilia 2/3 (describirla y verificar si existe antecedente familiar de esta característica)

Braquidactilia de uno o más dedos (especificar)

Clinodactilia (especificar) Polidactilia postaxial

Acortamiento del 1er dedo Flexión dorsal del 1er dedo (en "martillo")

Luxación/subluxación de cadera

Deformidades de pies (especificar)

Otras (especificar)

Anomalías costales y/o vertebrales (especificar)

Genitales:

- Criptorquidia Hipospadia Pene pequeño Escrotos pequeños
 Escrotos bífidos Genitales ambiguos Sexo reverso
 Hipoplasia labios menores/mayores
 Otras (especificar)

Otros defectos:

- Hoyuelo sacro profundo Hoyuelo anterior al ano Hernia inguinal
 Engrosamiento de la rafia ano-escrotal Fotosensibilidad Hipopigmentación cutánea
 Hiperhidrosis de las manos Acrocianosis Cutis marmorata
 Otros (especificar)

7.- Anomalías de órganos internos (especificar en cada caso):

- Cardiovasculares
 Digestivas
 Sistema nervioso central
 Renales
 Pulmonares
 Otras

8.- Función mental:

Retraso mental: Leve Moderado Severo

9.- Conducta:

- Trastornos del sueño (especificar)
 Autolesión: a) se muerde muñecas b) se golpea cabeza c) otras (especificar)
 Agresividad Hiperactividad Irritabilidad
 Hipersensibilidad a ruidos Hipersensibilidad a luz
 Hipersensibilidad táctil en manos y/o pies
 Crisis de opistosquinesis con o sin movimientos bruscos de cabeza y miembros
 Crisis de llanto y chillidos agudos durante la noche y primeras horas de la mañana

___ Movimientos estereotipados (ej "aleteo" con las manos, balanceo, manipular un mechón de pelo o tela, aplaudir, girar y correr en círculo, etc)

___ Fijación con objetos

___ Perseverancia de la uniformidad (realizar la misma actividad, de la misma forma, en el mismo orden, etc)

___ Resistencia al cambio de ambiente, personas, alimentos, etc

Contacto social:

___ Falta conducta de apego en 1er año de vida ___ No utiliza el llanto como mensaje

___ Sonrisa social pobre ___ Pobre contacto ocular ___ No busca relaciones de consuelo, apoyo

___ Prefiere jugar solo ___ No juegos de roles

Lenguaje:

Edad de inicio:

Cuántas palabras pronuncia ahora:

Ecolalia

¿Comprende mejor el lenguaje verbal o gestual? _____

___ Otros trastornos de conducta (especificar)

10.- Otros problemas de salud:

___ Constipación ___ Diarreas crónicas ___ Vómitos/reflujo ___ Inapetencia

___ Medicación actual (explicar)

11.- Desarrollo sicomotor

. Seguimiento visual:

. Sonrisa social:

. Sosten cefalico:

. Tomo los objetos con la mano:

. Se sento con apoyo:

. Se sento solo:

. Pinza digital:

. Se puso de pie por si solo:

. Camino aguantado de la mano:

.

Marcha:

- Tono muscular al nacimiento y primeros meses o años de vida y evolución posterior

12.- Estudios complementarios realizados:

Estudio

Fecha

Resultado

Anexo 11. Características generales de los pacientes cubanos con SLO

Paciente n.º	Sexo	Edad al diagnóstico bioquímico	Vía de diagnóstico	Etapa en que se diagnosticó	Colesterol (µmol/L)	7DHC (µmol/L)	Puntaje de severidad clínica	Genotipo
1	F	4 años	DCAI	I	2 170	311	17	T93M/IVS8-1G>C
2	M	1 año	DCAI	I	1 240	596	17	T93M/V281M
3	F	2 años	DCAI	I	1 160	276	22	T93M/IVS8-1G>C
4	M	2 años	DCAI	I	2 500	599	28	T93M/IVS8-1G>C
5	M	15 años	DCAI	I	1 650	427	11	T93M/IVS8-1G>C
6	M	16 años	DCAI	I	1 980	219	11	T93M/F302L
7	F	4 años	CGC	I	2 570	454	17	T93M/IVS8-1G>C
8	M	29 años	DCAI	I	2 070	302	17	T93M/T93M
9	F	12 años	DCAI	I	1 300	367	19	T93M/IVS8-1G>C
10	F	34 años	PI	I	2 830	283	10	T93M/D234Y
11	M	28 años	DCAI	II	ND	Elevado	11	IVS8-1G>C/?
12	F	6 años	DCAI	II	ND	Elevado	20	T93M/IVS8-1G>C
13	M	3 meses	CGC	II	ND	Elevado	25	IVS8-1G>C/?
14	M	4 años	CGC	II	ND	Elevado	10	T93M/T93M
15	M	4 días	CGC	II	ND	Elevado	35	No estudiado
16	M	26 años	CGC	II	ND	Elevado	11	IVS8-1G>C/?
17	M	5 meses	CGC	II	ND	Elevado	15	T93M/?
18	M	16 años	CGC	II	ND	Elevado	10	?/?
19	M	1 mes	CGC	II	ND	Elevado	33	?/?
20	M	2 años	CGC	II	ND	Elevado	17	T93M/IVS8-1G>C
21	M	6 meses	CGC	II	ND	Elevado	11	T93M/?

* Los pacientes 11 al 21 fueron estudiados por cromatografía de capa delgada, que es un método cualitativo
 ND - no determinado PI - pesquisa en instituciones DCAI - diagnóstico clínico antes de la investigación
 CGC - consultas de Genética Clínica ? - desconocido

Anexo 12. Principales características clínicas en diferentes series de pacientes publicadas

Autor	Kelley	Ryan	Goldenberg	Scalco	Ciara	Correa Cerro	Krajewska Walasek	Nowaczyk	Krakowiak	Guzzetta	Cardoso	Autores varios
N.º Pacientes	164	49	42	11	37	11 ¶	13 ¶	10	13	10	8	20
Hallazgo clínico %												
Retraso mental/sicomotor	95	92	100	91	NR	100	100	100	100	100	86	94
CIUR		16	74	NR	NR	9	33	30	8	40		5
Ganancia insuficiente de peso postnatal	82	88	100	9	NR	89	100	75	NR	100	NR	71
Microcefalia	84	80	100	100	89	-	-	50	100	100	88	67
Anteversión de narinas	78	69	93	91	NR	55	92	30	15	70	86	63
Estrechamiento bitemporal	Frec	NR	82	NR	NR	55	100	10	8	NR	NR	15
Ptois palpebral	70	59	63	91	NR	36	92	13	8	90	88	61
Estrabismo	Frec	16	NR	46	NR	9	69	0	8		29	6
Cataratas	22	12	14	18	8	-	-	0	8	10	29	17
Micrognatia	Frec	69	78	82	NR	91	NR	60	31	90	71	80
Paladar hendido*	47	29	70**	55	46	-	NR	70	8	30	63	40
Hipercrecimiento de arcos alveolares	Frec	37	NR	NR	NR	55	100	0	0	50	NR	17
Orejas bajas y/o rotación posterior	Frec	47	76	NR	NR	55	92	10	31	80	NR	40
Implantación proximal pulgar	Frec	49	25	NR	NR	64	NR	20	8	NR	NR	5
Polidactilia manos y/o pies	52	53	56	0	54	-	-	40	23	20	13	40
Braquidactilia	Ocas	20	30	NR	NR	18	69	10	15	NR		NR
Sindactilia 2-3 pies	97	90	92	100	95	-	-	80	100	90	100	95
Anomalías genitales en varones	Frec	91	99	100	89	-	-	75	86	100	75	64

Fuente: Referencias Kelley: 15, Ryan: 51, Goldenberg: 50, Scalco: 83, Ciara: 52, Krajewska-Walasek: 190, Krakowiak: 54, Correa-Cerro: 49, Guzzeta: 85, Cardoso: 76, Nowaczyk: 110,191,193,195,253 Autores varios: 79,170,196,197,198,254,255-262 ¶ Pacientes incluidos en la serie de Ciara * Incluye hendidura de paladar blando y hendidura submucosa ** Incluye el paladar alto y estrecho NR- No referido Frec-Frecuente Ocas- Ocasional

Anexo 13. Principales características clínicas en pacientes publicados con SLO y dismorfia facial ligera

	Reportes en la literatura														
	Krakowiak	Bukelis	Nowaczyk	Prasad	Nezarati		Jezela-Stanek				Langius			Mueller	
Paciente	6		3		1	2	1	2	3	4	5	1	2	3	
Sexo	F	M	F	F	M	F	M	M	F	M	M	M	M	F	M
Dificultades en la alimentación	x	x	x	x			x	x	x	x	x				
Pobre ganancia de peso	x	x	x	x		x	x	x	x	x					
Hipotonía temprana	x	x		x											
Microcefalia	x				x	x	x	x	x	x	x			x	x
Retardo pondoestatural	x		x		x	x								x	
Ptosis palpebral				ligera	x	x	x	x	x	x	x				x
Narinas anchas, cortas y/o anteversión	ligera	ligera	ligera	ligera			x	x	x	x	x			x	
Orejas bajas y/o rotación posterior		x			x			x		x					
Micrognatia			ligera		x	x	x	x	x	x	x	x			x
Paladar hendido											x				
Sindactilia 2-3 pies	x	x	ligera	x	ligera	x	ligera	ligera	x	x	x	x	x		x
Malformaciones genitales							x			x	x	x			
Malformaciones internas	PCA								x		x				x
Trastornos conducta	x	x	x	x		x	x	x			x				
Retraso mental o del desarrollo sicomotor	x	x	x	x	ligero	ligero	x	x	ligero	ligero	x			ligero	ligero

Fuente: Referencias Krakowiak: 54, Bukelis: 63, Nowaczyk: 110, Prasad: 201, Nezarati: 79, Jezela-Stanek: 112, Langius: 84, Mueller: 198
del conducto arterioso

PCA: Persistencia

Anexo 14. Frecuencia global de las malformaciones congénitas de órganos internos según aparato y defectos más frecuentes de cada grupo en diferentes series de pacientes

Autor	Kelley	Ryan	Goldenberg	Scalco	Ciara	Nowaczyk	Krakowiak	Cardoso	Autores varios
N.º pacientes	164	49	42	11	37	10	13	8	20
Frecuencia global (%) y anomalías más frecuentes									
Aparato cardiovascular	54 CAV CIA PCA CIV	37 CAV CoA PCA	61 CIA/CIV PCA CoA	0	43 CIA PCA CAV Hipopl VI	50 CIA CIV CAV	54 PCA CAV CoA CIA	50 CIV	55 CIA PCA CAV
Aparato respiratorio		24 DSP	17 Hipoplasia y DSP	0	0	30 DSP	8 DSP	17 Hipoplasia y DSP. Anomalia laringe y tráquea	0
Aparato digestivo	AI-16 % EHP -14 %	31 EHP AI	38 EHP	0	19 EHP AI	20 AI	23 AI Microgastria	29 EHP AI	20 EHP
Aparato urinario	43	29 A/HR	40 Anomalías pieloureterales A/HR	0	24 A/HR	30 A/HR	23 A/HR	25 A/HR	30 A/HR
SNC	37	21 A/HCC	48 A/HCC Hidrocefalia	0	16 A/HCC	20 A/HCC, HPE Dandy Walker	0	0	20 A/HCC

Fuente: Referencias Kelley: 15, Ryan: 51, Goldenberg: 50, Scalco: 82, Ciara: 53, Nowaczyk: 110,191,193,195,253; Krakowiak: 54, Cardoso: 76, Autores varios: 79,170,196,197,198,254,255-262

CAV-canal aurículoventricular CIA-comunicación interauricular CIV- comunicación interventricular
CoA-coartación aorta PCA-persistencia conducto arterioso Hipopl VI-hipoplasia del ventrículo izquierdo

DSP-defecto segmentación pulmonar AI-agangliosis intestinal EHP-estenosis hipertrófica piloro
A/HR-agenesia/hipoplasia renal A/HCC-agenesia/hipoplasia cuerpo calloso

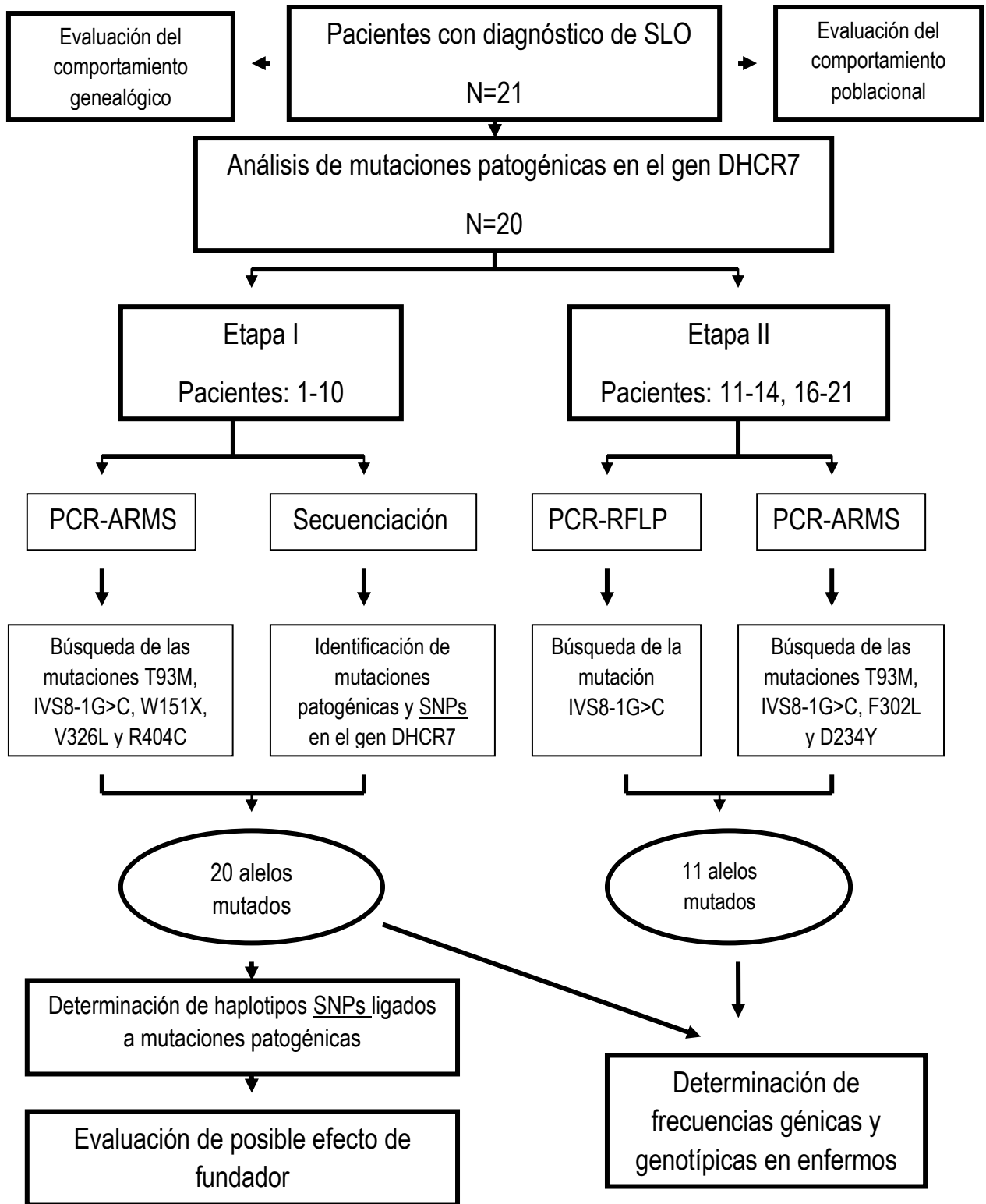
ANEXOS

CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

DEL SÍNDROME DE SMITH LEMLI OPITZ

EN CUBA

Anexo 15. Flujo de trabajo seguido para la caracterización genética del síndrome SLO en Cuba



Anexo 16. Haplotipos en el gen DHCR7 basado en SNPs en ocho posiciones intragénicas

Haplotipo	Polimorfismo							
	c.189	c.207	c.231	c.438	c.969	c.1 158	c.1 272	c.1 350
A	A	C	C	C	G	C	T	C
B	G	C	C	C	G	C	T	C
C	A	C	C	C	G	C	C	C
D	A	C	T	C	G	C	T	C
E	G	C	T	C	G	C	T	C
F	G	C	C	C	G	C	C	C
G	G	C	C	C	G	C	C	A
H	G	T	C	C	G	T	C	C
I	G	T	T	T	G	T	C	C
J	G	C	T	C	G	C	C	C
K	G	T	C	T	G	T	C	C
L	A	C	T	C	G	C	C	C

Fuente: Referencia 72

Anexo 17. Frecuencia comparativa de los alelos DHCR7 identificados en pacientes cubanos con SLO respecto a otras poblaciones

Países	Número de alelos estudiados	Mutaciones				
		T93M %	IVS8-1G>C %	F302L %	V281M %	D234Y %
Cuba	40	42,5	27,5	2,5	2,5	2,5
Canadá	60	8	40	no	no	no
EE.UU	114	9	39	< 5	< 5	no
Reino Unido	80	< 5	47	< 5	no	no
Francia	108	< 5	46	< 5	no	no
Alemania	86	< 5	30	no	no	no
Polonia	56	< 5	< 5	no	no	no
República Checa y Eslovaquia	20	no	5	no	no	no
Hungría	24	no	17	no	no	no
Turkía	28	36	< 5	no	no	no
Italia	40	28	23	no	no	no
Portugal	16	31	25	no	no	no
Brasil	28	32	29	no	no	no
España	54	17	33	15	no	no

Fuente: Referencias 45,72,73,75,76,78,112,211,212,236

Anexo 18. Pacientes observados y esperados según la ley de Hardy Weinberg para los genotipos T93M/T93M, T93M/IVS8-1G>C y IVS8-1G>C/IVS8-1G>C en 58 pacientes con SLO procedentes de Cuba, Italia, Portugal y Brasil, cuya frecuencia génica de T93M y IVS8-1G>C es de 0,35 y 0,24; respectivamente

Genotipo	Frecuencia fenotípica esperada	Pacientes observados	Pacientes esperados
T93M/T93M	0,1225 (12,25 %)	4	7
T93M/IVS8-1G>C	0,168 (16,8 %)	16	10
IVS8-1G>C/IVS8-1G>C	0,0576 (5,76 %)	1*	4

Fuente: Referencias 76,212,234,261

* Paciente fallecido en periodo neonatal

ANEXOS

CAPÍTULO 4. CORRELACIÓN ENTRE LOS FENOTIPOS BIOQUÍMICO Y CLÍNICO Y EL GENOTIPO DHCR7

Anexo 19. Comportamiento de los parámetros bioquímicos (colesterol y 7DHC) en 142 pacientes con SLO reportados en la literatura

Variable	MI	MA	Q1	Q2	Q3	ME	DE	CV
Colesterol ($\mu\text{mol/L}$)	9,08	5 408	439,62	1 012,41	2 327,39	1 444,7	1 203,52	0,83
7DHC ($\mu\text{mol/L}$)	4,13	1 261	133,75	266,5	468,57	345,17	291,72	0,84

MI: mínimo valor, MA: máximo valor, Q1: percentil 25 %, Q2: mediana, Q3: percentil 75 %, ME: media, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Fuente: Referencias 45,49,54,76,212,233,234

Anexo 20. Coeficiente de correlación lineal entre los niveles de colesterol y 7DHC en 142 pacientes con SLO reportados en la literatura

Variable	Coeficiente de correlación de Pearson (p valor)
	7DHC ($\mu\text{mol/L}$)
Colesterol ($\mu\text{mol/L}$)	-0,123 (0,14)

Fuente: Referencias 45,49,54,76,212

Anexo 21. Comportamiento de los parámetros bioquímicos (colesterol y 7DHC) según los genotipos TM/0 y TM/TM presentes en 50 y 16 pacientes con SLO, respectivamente, reportados en la literatura

Genotipo	Variable	MI	MA	Q1	Q2	Q3	ME	DE	CV
TM/0	Colesterol ($\mu\text{mol/L}$)	36,2	3 432	231,45	998,19	1 900,82	1 168,21	913,2	0,78
	7DHC ($\mu\text{mol/L}$)	5,98	1 261	66,19	202,24	374,25	273,65	252,96	0,92
TM/TM	Colesterol ($\mu\text{mol/L}$)	100,08	5 408	260,53	2 307,41	3 766,5	2 209,62	1 815,8	1,12
	7DHC* ($\mu\text{mol/L}$)	18,2	767	45,32	141	341,5	226,56	239,16	0,78

MI: mínimo valor, MA: máximo valor, Q1: percentil 25 %, Q2: mediana, Q3:percentil 75 %, ME: media, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

* Cálculo basado en la evidencia aportada por 14 pacientes

Fuente: Referencias 45,53,54,76,78,198,201,231,233,234,236

Anexo 22. Comportamiento de los parámetros bioquímicos (colesterol y 7DHC) según los genotipos T93M/IVS8-1G>C y T93M/T93M presentes en 14 y 6 pacientes con SLO, respectivamente, reportados en la literatura

Genotipo	Variable	MI	MA	Q1	Q2	Q3	ME	DE	CV
T93M/IVS8-1G>C	Colesterol (μmol/L)	70,86	2 200	76,93	998,2	1 732,61	984,49	803,01	0,81
	7DHC (μmol/L)	41,07	759,03	64,47	223,86	396,75	266,19	212,88	0,8
T93M/T93M	Colesterol (μmol/L)	222,39	3 600	241,78	588,2	3 520,5	1 456,83	1 637,43	1,12
	7DHC* (μmol/L)	60,31	390	78,73	141	329,5	183,07	143,21	0,78

MI: mínimo valor, MA: máximo valor, Q1: percentil 25 %, Q2: mediana, Q3: percentil 75 %, ME: media, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

* Cálculo basado en la evidencia aportada por 4 pacientes

Fuente: Referencias 45,54,76,78,233,234,236

Anexo 23. Comportamiento del puntaje de severidad clínica según los genotipos TM/0 y TM/TM en 60 y 29 casos con SLO, respectivamente, reportados en la literatura

Genotipo	Puntaje de severidad clínica							
	MI	MA	Q1	Q2	Q3	ME	DE	CV
TM/0	2	79	17	23,5	32,75	27,12	16,74	0,26
TM/TM	5	60	16,5	20	36	25	13,2	0,28

MI: mínimo valor, MA: máximo valor, Q1: percentil 25%, Q2: mediana, Q3: percentil 75%, ME: media, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

Fuente: Referencia 14

Anexo 24. Representación esquemática de los factores que intervienen en la expresión fenotípica del SLO

