

Diagnóstico bioquímico del síndrome de Smith-Lemli-Opitz en un paciente con hiperplasia adrenal congénita

E. García-Fuentes^a, M.^aI. Vicioso Recio^a, E. del Castillo Acedo del Olmo^a, M.^aD. Matas Jurado^b, M. Arana Agüera^c y J. López López^c

Servicios de Laboratorio. ^aHospital Materno-Infantil y ^bHospital Regional Carlos Haya. ^cDepartamento de Pediatría. Hospital Materno-Infantil. Málaga.

(*An Esp Pediatr* 2000; 53: 482-487)

Objetivo

El síndrome de Smith-Lemli-Opitz es una alteración de herencia autosómica recesiva causada por un fallo de la enzima 7-deshidrocolesterol Δ^7 -reductasa, produciendo unos bajos valores séricos de colesterol y la acumulación de su precursor, el 7-deshidrocolesterol. Se presenta el caso de un niño de 3 meses de edad con hiperplasia adrenal congénita y con el diagnóstico clínico previo de dicho síndrome. Se pretende confirmar bioquímicamente el diagnóstico clínico del síndrome de Smith-Lemli-Opitz.

Métodos

Se determinó el 7-deshidrocolesterol en suero por espectroscopia ultravioleta (determinación cualitativa) mediante un método rápido y sencillo, recientemente propuesto, y por cromatografía gaseosa (determinación cuantitativa).

Resultados

La determinación por espectroscopia ultravioleta revela la presencia en suero del 7-deshidrocolesterol, confirmada posteriormente por cromatografía gaseosa. Así mismo, el paciente presentaba unas concentraciones muy disminuidas de colesterol total.

Conclusiones

Se expone el caso de un paciente con síndrome de Smith-Lemli-Opitz e hiperplasia adrenal congénita, asociación descrita en muy pocos casos. Los resultados obtenidos indican que el diagnóstico clínico del síndrome de Smith-Lemli-Opitz puede confirmarse bioquímicamente por la medida cualitativa del 7-deshidrocolesterol mediante espectroscopia ultravioleta.

Palabras clave:

Síndrome de Smith-Lemli-Opitz. Colesterol. 7-Desidrocolesterol. Espectroscopia ultravioleta. Hiperplasia adrenal congénita.

BIOCHEMICAL DIAGNOSIS OF SMITH-LEMLI-OPITZ SYNDROME IN A PATIENT WITH CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA

Background

Smith-Lemli-Opitz syndrome is an autosomal recessive disorder caused by 7-dehydrocholesterol Δ^7 -reductase deficiency that leads to serum cholesterol deficiency and accumulation of the cholesterol precursor, 7-dehydrocholesterol. We report a three-month-old boy with congenital adrenal hyperplasia and clinical diagnosis of this syndrome. This study was undertaken to confirm biochemically the clinical diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome.

Methods

Serum 7-dehydrocholesterol was determined in serum by ultraviolet spectroscopy (qualitatively) using a recently described simple and rapid method, and by gas chromatography (quantitatively).

Results

The ultraviolet spectroscopy assay detected serum 7-dehydrocholesterol. This result was confirmed by gas chromatography. Furthermore, the patient showed very low total cholesterol.

Conclusions

The association between Smith-Lemli-Opitz syndrome and congenital adrenal hyperplasia has been reported in only a few cases. Our results suggest that clinical diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome can be biochemically confirmed by qualitative measurement of 7-dehydrocholesterol using ultraviolet spectroscopy.

Key words:

Smith-Lemli-Opitz syndrome. Cholesterol. 7-dehydrocholesterol. Ultraviolet spectroscopy. Congenital adrenal hyperplasia.

Correspondencia: Dra. M.^aI. Vicioso Recio. Servicio de Laboratorio. Hospital Materno-Infantil. Avda. Arroyo de los Angeles, s/n. 29011 Málaga.

Recibido en febrero de 2000.

Aceptado para su publicación en julio de 2000.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Smith-Lemli-Opitz (S-SLO), inicialmente descrito por Smith et al en 1964¹, es un cuadro polimalformativo, que presenta un amplio número de defectos congénitos. Entre éstos pueden citarse: micrognatia, microcefalia, ventanas nasales en anteversión, polidactilia rudimentaria, hipospadias y anomalías en otros órganos. Este síndrome se diagnosticaba basándose en criterios clínicos hasta que Irons et al² encontraron disminuido en suero el colesterol y aumentado el de su precursor, el 7-deshidrocolesterol (7-DHC). Estos hallazgos se atribuyen a una grave deficiencia en la actividad de la enzima 7-deshidrocolesterol Δ^7 -reductasa (7-DHCR) responsable de la conversión del 7-DHC a colesterol^{2,3}. Esta enzima es una proteína integral de membrana que se expresa en la mayoría de los tejidos, pero sobre todo en la glándula suprarrenal, hígado y cerebro⁴.

Este síndrome está producido por la alteración de un gen autosómico recesivo. La publicación de 1 caso que presenta una translocación balanceada entre los cromosomas 7 y 20 [t(7;20) (q32.1; q13.2)], y posteriores estudios por hibridación *in situ* (FISH), permitieron suponer que los genes responsables se encontraban en la región del cromosoma 7q32.1^{5,6}. Estudios más recientes proponen defectos en el gen localizado en el cromosoma 11q13⁷⁻⁹. Tint et al¹⁰ demostraron que los dos fenotipos del síndrome, tipo I y tipo II (menor y mayor intensidad fenotípica, respectivamente) están producidos por el mismo defecto metabólico, y que la diferencia se debe al grado de bloqueo en la conversión enzimática del 7-DHC a colesterol. Esta diferencia parece ser originada por el tipo de mutación que se encuentra en los alelos del gen de la 7-DHCR⁴.

En mujeres embarazadas cuyo feto se encuentra afectado por este síndrome, se demuestra un aumento del 7-DHC en el líquido amniótico^{11,12}, así como una disminución del estriol no conjugado (α E3) en el suero materno^{12,13} y puede servir como diagnóstico prenatal.

La frecuencia del síndrome en la República Checa es de 1:9.000 con 1:50 portadores de la mutación en heterocigosis¹⁴, y en la población caucásica de América del norte es de 1:20.000 recién nacidos¹⁵. En España, existen descritos unos 20 casos, la mayoría basados en la sintomatología, no en datos bioquímicos^{16,17}.

El colesterol es el precursor de numerosas moléculas entre las que se encuentran las hormonas esteroideas. La esteroidogénesis se ve afectada por diversas causas, una de ellas la hiperplasia adrenal congénita. Se produce un bloqueo en la síntesis de cortisol con la acumulación de su precursor, la 17-hidroxiprogesterona.

El principal objetivo de este estudio fue confirmar bioquímicamente el diagnóstico del síndrome en un niño de 3 meses con el fenotipo típico de dicha enfermedad y comprobar la posible utilización del método empleado

como prueba diagnóstica. Además, se desea poner de manifiesto un caso de hiperplasia adrenal congénita en un paciente con Síndrome de Smith-Lemli-Opitz, asociación que no se ha encontrado frecuencia.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se trataba de un varón, primer hijo de padres sanos no consanguíneos. Entre los antecedentes obstétricos de la madre, destacaba haber tenido un aborto 3 años antes. En el embarazo, se detectó oligoamnios y retraso del crecimiento intrauterino. El parto fue por cesárea, a las 40 semanas de edad gestacional, y no precisó reanimación.

En la exploración física en el momento del nacimiento el neonato pesaba 2.150 g (por debajo del percentil 10 para la edad gestacional), la talla era de 46 cm y el perímetro craneal de 30 cm (ambos por debajo del percentil 10 para la edad gestacional). Mostraba microcefalia, frente estrecha, epicanto, raíz nasal plana, ventanas nasales antevertidas y cuello corto con pterigión. En las extremidades destacaban las manos, anchas y cortas, el talón prominente en ambos pies y sindactilia de segundo y tercer dedo de los pies. En el aparato genitourinario, presenta un pene de longitud normal pero con hipospadias grave en el rafe medio, criptorquidia bilateral con testes palpables en canal inguinal, e hipodesarrollo de bolsas escrotales (fig. 1). A los 6 días de vida se realizó la primera consulta cardiológica, en la que se diagnosticó insuficiencia cardíaca, comunicación intraventricular subaórtica más acabalgamiento (tipo Eisenmenger) y *ductus*.

El estudio cromosómico, realizado a los pocos días de nacer mediante cultivo de 72 h de sangre periférica en un medio convencional y tras aplicación de bandas G, reveló cariotipo masculino normal 46,XY.

Al mes de vida ingresó con un cuadro febril y mal estado general. Presentaba hipotonía generalizada, palidez de piel y de mucosas y escaso panículo adiposo, así como sequedad de mucosas.

Se llevó a cabo estudio hormonal que reveló valores de 17-hidroxiprogesterona superiores a la normalidad. Se diagnosticó hiperplasia adrenal congénita, y se inició tratamiento con hidrocortisona.

A los 3 meses se sospechó clínicamente la posibilidad de un síndrome de Smith-Lemli-Opitz. Así mismo, coincidiendo con el deterioro del enfermo durante un nuevo proceso febril, es visto de nuevo por el servicio de cardiología, diagnosticándose de una cardiopatía tipo Fallot.

Al cuarto mes de vida se inició tratamiento con colesterol oral, y se constató ganancia ponderal.

Hasta el momento de su fallecimiento, a los 6 meses de vida, se repitieron los ingresos por infecciones respiratorias, y una de ellas le causó la muerte. Su peso era de 2.660 g. No se realizó necropsia.

Determinaciones hormonales

Con un mes de vida se inició el estudio hormonal. Se determinó la ACTH por IRMA (Nichols Institute Diagnostics, USA), androstendiona y 17-hidroxiprogesterona por radioinmunoanálisis (RIA) (Immunotech, Francia), actividad renínica plasmática por RIA (DiaSorin, USA) y el cortisol por quimioluminiscencia directa en un ASC:180 PLUS (Chiron Diagnostics).

Determinaciones bioquímicas

Se recogieron muestras de sangre del niño a los 3 meses de edad y de sus padres. Como controles se obtuvieron muestras pertenecientes a niños sin los signos característicos de este síndrome, entre 1 y 12 meses de edad. También se analizaron muestras de adultos considerados normales.

La concentración sérica de colesterol total (CT) se realizó mediante el método enzimático CHOD-PAP en un autoanalizador Olympus AU800 (Olympus Diagnostica, Ireland).

Determinación cualitativa del 7-deshidrocolesterol

Para la medición del 7-deshidrocolesterol libre más esterificado, se siguió el método de determinación simple y rápido propuesto por Honda et al¹⁸. Se tomaron alícuotas de 200 µl de suero en tubos de cristal, añadiéndoles 1,2 ml de mezcla extractora, n-hexano:etanol (5:1, v/v). Tras agitación durante 30 seg y centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 1 min, se recogió la fase superior (n-hexano) y se depositó en una cubeta de cuarzo para la medida de la absorbancia en el ultravioleta (UV), realizándose mediciones consecutivas en un rango de longitudes de onda comprendido entre 220 y 300 nm, utilizándose n-hexano como blanco. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Ultrospec III, Pharmacia LKB, Sweden.

Determinación por cromatografía de gases

La presencia cualitativa al UV del 7-DHC fue confirmada cuantitativamente por la medida de la concentración de colesterol y su precursor, el 7-DHC por cromatografía gaseosa.

Estadística

Los datos se expresan como media ± DE.

RESULTADOS

El suero del paciente con síndrome de Smith-Lemli-Opitz muestra unos picos de absorbancia máximos a 271, 282 y 294 nm, característicos del 7-DHC (fig. 2). Los sueros de los padres así como de los respectivos controles no mostraron el incremento de absorción (fig. 2). En la figura 3 se muestra que la relación entre las absorbancias a 282 y 234 nm es muy superior en el paciente con síndrome de Smith-Lemli-Opitz (2.88). El análisis por



Figura 1. Paciente con el fenotipo característico del síndrome de Smith-Lemli-Opitz.

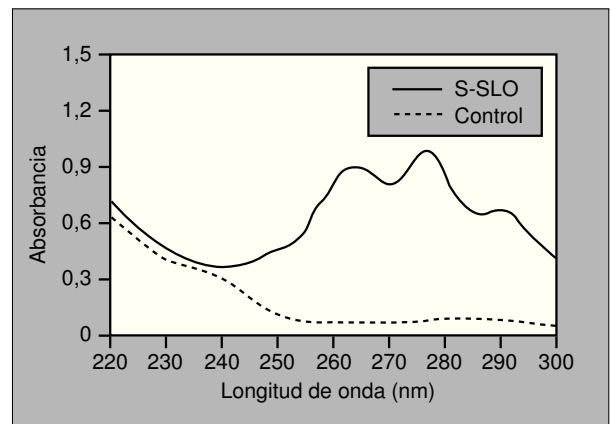


Figura 2. Espectro ultravioleta obtenido a partir del suero del niño con síndrome de Smith-Lemli-Opitz (S-SLO) y de un control de la misma edad (semejante al obtenido para los padres y sus controles).

cromatografía con gases reveló unos valores de 7-DHC de 42,9 mg/dl.

El nivel de colesterol total se encuentra disminuido (40 mg/dl). En los padres las determinaciones bioquímicas realizadas fueron normales (tabla 1).

Las determinaciones hormonales del paciente muestran una concentración elevada de 17-hidroxiprogesterona

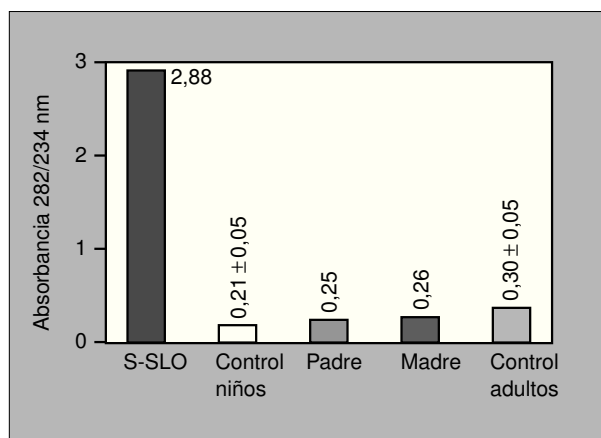


Figura 3. Absorbancia 282/234 en el niño con síndrome de Smith-Lemli-Opitz, sus padres y los respectivos controles.

(> 20 ng/ml), ACTH moderadamente elevada (82 pg/ml), cortisolemia algo baja (97 ng/ml), androstendiona normal (1,60 ng/ml) y actividad de renina plasmática normal (2,55 ng/ml/h).

DISCUSIÓN

El síndrome de Smith-Lemli-Opitz es una enfermedad de herencia autosómica recesiva caracterizada por una alteración multisistémica generalizada con numerosas anomalías fenotípicas. Aunque este síndrome suele tener un fenotipo característico, en algunas ocasiones puede plantearse el diagnóstico diferencial con el síndrome de Gardner-Silengo-Wachtel¹⁹, síndrome de Pallister-Hall, síndrome de Meckel, cromosopatías, etc. Un fallo metabólico causado por un defecto en la actividad de la enzima 7-DHC- Δ^7 -reductasa^{2,3}, en una proteína reguladora o de un cofactor de la 7-DHCR⁷, es el responsable de este cuadro clínico. En enfermos homocigotos, los valores plasmáticos de colesterol son anormalmente bajos, con altas concentraciones de su precursor, el 7-DHC (5,7-colestandien-3 β -ol) (presente en la sangre en concentraciones casi indetectables²⁰) y sus isómeros, el 8-deshidrocolesterol (5,8-colestandien-3 β -ol)²¹ y el 19-nor-5,7,9 (10)-colestántrien-3 β -ol²², así como algunos derivados oxigenados.

Todos los signos clínicos del paciente indican que se trata de un caso de síndrome de Smith-Lemli-Opitz. Sin embargo, algunos pacientes con diagnóstico clínico de dicho síndrome tienen normal el metabolismo del colesterol, lo cual sugiere que puedan presentar otro defecto genético distinto²³. Por ello, el diagnóstico clínico de este síndrome debe de confirmarse bioquímicamente.

Como se muestra en la tabla 1, el paciente muestra unos valores de colesterol, obtenidos mediante el método enzimático CHOD-PAP, muy por debajo del intervalo hallado para su edad. Sin embargo, dicha concentración de colesterol es más alta que la obtenida por cromatografía de gases, coincidiendo en este sentido con otros trabajos^{24,25}. Estas diferencias se deben a que la enzima colesterol oxidasa (utilizada en el método CHOD-PAP) no diferencia entre el colesterol y el 7-DHC. La cromatografía de gases y la combinación cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) son los mejores métodos para la determinación de estos compuestos en este síndrome, como se ha comprobado. Su alto coste y sofisticación no permite disponer habitualmente de ellos en los laboratorios. Algunos métodos descritos recientemente permiten determinar por espectrofotometría ultravioleta (UV)^{18,26} la presencia del 7-DHC, uno de los cuales hemos utilizado. Aunque no es tan sensible como los anteriores, es lo suficiente como para detectar el 7-DHC (fig. 2). Tiene la ventaja de su rapidez y sencillez y no encontrarse interferencias. Al igual que en dicho estudio, se comprueba que además de presentarse una absorbancia máxima a 271, 282 y 294 nm, también se presentan unos valores bastante elevados en la relación entre las absorbancias a 282/234 nm. Ambos resultados pueden utilizarse para la detección del síndrome de Smith-Lemli-Opitz.

Tal y como se ha comprobado en nuestro paciente, los valores de colesterol total se encuentran significativamente disminuidos, así como bastante elevada la concentración del 7-DHC. Los resultados obtenidos nos permiten confirmar bioquímicamente que el paciente se encuentra afectado de forma grave por el síndrome.

En los padres no se observan ni las alteraciones fenotípicas ni bioquímicas típicas de este síndrome, lo cual concuerda con estudios previos en los que se demuestra que en los sujetos heterocigotos, tanto los valores de co-

TABLA 1. Concentraciones de colesterol total y 7-deshidrocolesterol en el niño con síndrome de Smith-Lemli-Opitz, sus padres y sus respectivos controles

	Paciente	Control niños (n = 40)	Padre	Madre	Control adultos (n = 40)
CT	40	149,86 ± 23,47*	161	204	191,00 ± 25,79*
CT (CG)	29,2	100-180	ND	ND	ND
7-DHC (CG)	49,2	< 0,3	ND	ND	ND

* Media ± DE.

CT: colesterol total; CG: cromatografía de gases; 7-DHC: 7-deshidrocolesterol; ND: no determinados. Los datos están expresados en mg/dl.

lesterol total como los de 7-DHC son normales¹⁴. Estos sujetos pueden ser detectados por la determinación de la actividad enzimática en fibroblastos²⁷.

El colesterol es también el precursor de las hormonas esteroides. El cortisol es sintetizado en las glándulas suprarrenales, uno de los tres sitios donde más se sintetiza la 7-DHCR. Un fallo en la síntesis de las hormonas esteroides puede ser debido a numerosas causas. Entre ellas se encuentran fallos en la entrada de colesterol en la mitocondria²⁸, o principalmente defectos en las enzimas implicadas, como en el caso de la hiperplasia adrenal congénita. Los datos de nuestro paciente coinciden con esta última enfermedad.

Se han mencionado pocos casos de asociación entre el síndrome de Smith-Lemli-Opitz y fallos en las glándulas suprarrenales. En un estudio realizado por Anderson et al²⁹ se comenta la presencia de hiperplasia suprarrenal congénita en dos tíos por parte materna de un paciente con el síndrome, no en el propio caso presentado. En otros casos se encuentran trastornos de insuficiencia suprarrenal, mientras que en otro estudio³¹ se observa un recién nacido varón con este síndrome una concentración de cortisol semejante a la nuestra, en el que no se mencionan alteraciones de insuficiencia suprarrenal y en el cual el tratamiento con colesterol mejoró la biosíntesis de cortisol y andrógenos. Sin embargo, en otras ocasiones no se ponen de manifiesto trastornos relacionados con los valores de hormonas esteroides¹⁷.

Según todo esto, puede existir una cierta relación entre estas dos enfermedades, aunque no de forma muy clara. Este déficit de colesterol puede ser el causante de la disminución de la síntesis de hormonas adrenales esteroides³⁰, aunque también puede estar relacionado con fallos en el transporte (28), en las membranas intracelulares o en el proceso de síntesis de los esteroides. En cualquier caso, se necesitan más estudios para comprobar el efecto de este síndrome sobre la síntesis de hormonas esteroides, o la relación entre ambas enfermedades.

En conclusión, aunque los datos clínicos de los pacientes puedan ser suficientes para el diagnóstico del síndrome de Smith-Lemli-Opitz, actualmente se necesita de la detección de los valores de colesterol y 7-DHC para establecer un diagnóstico de certeza. La correcta identificación de ambos compuestos se realiza mediante cromatografía de gases, método de alto coste y sofisticación. Gracias al método recientemente descrito y utilizado en este estudio, la simple medida del suero en el UV proporciona una forma rápida y sencilla de detectar el 7-DHC. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto un caso de hiperplasia adrenal congénita en un paciente con este síndrome, lo cual podría tener relevancia desde el punto de vista clínico por el posible abordaje diagnóstico de esta enfermedad a partir de una situación de déficit de hormonas esteroides.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de la Dra. Manuela Martínez, del Centro de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, Laboratorio de Lípidos y Desarrollo Cerebral Humano del Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d'Hebron, Barcelona (España), por la determinación por cromatografía de gases del colesterol y sus precursores.

BIBLIOGRAFÍA

- Smith DW, Lemli L, Opitz JM. A newly organized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr* 1964; 64: 210-217.
- Irons M, Elias ER, Salen G, Tint GS, Batta AK. Defective cholesterol biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet* 1993; 341: 1414.
- Irons M, Elias ER, Tint GS, Salen G, Frieden R, Buie TM et al. Abnormal cholesterol metabolism in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: report of clinical and biochemical findings in four patients and treatment in one patient. *Am J Med Genet* 1994; 50: 347-352.
- Fitzky BU, Glossmann H, Utermann G, Moebius FF. Molecular genetics of the Smith-Lemli-Opitz syndrome and postsqualene sterol metabolism (review). *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 123-131.
- Alley TL, Gray BA, Lee SH, Scherer SW, Tsui LC, Tint GS et al. Identification of a yeast artificial chromosome clone spanning a translocation breakpoint at 7q32.1 in a Smith-Lemli-Opitz syndrome patient. *Am J Med Genet* 1995; 56: 1411-1416.
- Alley TL, Scherer SW, Huizenga JJ, Wallance MR. Physical mapping of the chromosome 7 breakpoint region in an SLOS patient with t(7;20) (q32.1;q13.2). *Am J Med Genet* 1997; 68: 279-281.
- Fitzky BU, Witsch-Baumgartner M, Erdel M, Lee JN, Paik YK, Glossmann H et al. Mutations in the (delta)7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8181-8186.
- Wassif CA, Maslen C, Kachilele-Linjewile S, Lin D, Linck LM, Connor WE et al. Mutation in the human sterol [delta]7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 55-62.
- Waterham HR, Wijburg FA, Hennekam RC, Vreken P, Poll-The BT, Dorland L et al. Smith-Lemli-Opitz syndrome is caused by mutation in the 7-dehydrocholesterol reductase gene. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 329-338.
- Tint GS, Salen G, Batta AK, Shefer S, Irons M, Elias ER et al. Severity and outcome correlate with plasma sterol levels in type I and type II variants of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Pediatr* 1995; 127: 82-87.
- Tint GS, Abuelo D, Till M, Cordier MP, Batta AK, Shefer S et al. Fetal Smith-Lemli-Opitz syndrome can be detected accurately and reliably by measuring amniotic fluid dehydrocholesterol. *Prenatal Diagnosis* 1998; 18: 651-658.
- Kratz LE, Kelley RI. Prenatal diagnosis of the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet* 1999; 82: 376-381.
- Angle B, Tint GS, Yacoub OA, Clark AL. Atypical case of Smith-Lemli-Opitz syndrome: implications for diagnosis. *Am J Med Genet* 1998; 80: 322-326.
- Salen G, Shefer S, Batta AK, Tint GS, Xu G, Honda A et al. Abnormal cholesterol biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz (review). *J Lipid Res* 1996; 37: 1169-1180.
- Opitz JM, de la Cruz F. Cholesterol metabolism in the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: summary of an NICHD conference. *Am J Med Genet* 1994; 50: 326-338.

16. Opitz JM, Penchaszadeh VB, Holt MC, Spano LM, Smith VL. Smith-Lemli-Opitz (RSH) syndrome bibliography: 1964-1993. *Am J Med Genet* 1994; 50: 339-343.
17. De la Torre Verdu M, Vázquez López M, Carrasco Marina L, Giros ML, Quijano Roy S, Arregui Sierra A. Síndrome de Smith-Lemli-Opitz. Anomalía en la síntesis de colesterol. *An Esp Pediatr* 1997; 46: 617-620.
18. Honda A, Batta AK, Salen G, Tint GS, Chen TS, Shefer S. Screening for abnormal cholesterol biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: rapid determination of plasma 7-dehydrocholesterol by ultraviolet spectrometry. *Am J Med Genet* 1997; 68: 288-293.
19. Greenberg F, Gresik MV, Carpenter RJ, Law SW, Hoffman LP, Ledbetter DH. The Gardner-Silengo-Wachtel or genito-palato-cardiac syndrome: male pseudohermaphroditism with micrognathia, cleft palate and conotruncal cardiac defect. *Am J Med Genet* 1987; 26: 59-64.
20. Axelson M. Occurrence of isomeric dehydrocholesterol in human plasma. *J Lipid Res* 1991; 32: 1441-1448.
21. Batta AK, Tint GS, Shefer S, Abuelo D, Salen G. Identification of 8-dehydrocholesterol (cholesta-5,8-dien-3 β -ol) in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res* 1995; 36: 705-713.
22. Batta AK, Salen G, Tint GS, Shefer S. Identification of 19-nor-5,7,9-(10)-cholestantrien-3 β -ol in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res* 1995; 36: 2413-2414.
23. Cunniff C, Kratz LE, Moser A, Natowicz MR, Kelley RI. Clinical and biochemical spectrum of patients with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome and abnormal cholesterol metabolism. *Am J Med Genet* 1997; 68: 263-269.
24. Tint GS, Irons M, Elias ER, Batta AK, Frieder R, Chen TS et al. Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Engl J Med* 1994; 330: 107-113.
25. Jira P, De Jong J, Janssen-Zijlstra F, Wendel U, Wevers R. Pitfalls in measuring plasma cholesterol in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Chem* 1997; 43: 129-133.
26. 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: 937-942.
27. Honda M, Tint GS, Shefer S, Honda A, Batta AK, Xu G et al. Accurate detection of Smith-Lemli-Opitz syndrome carriers by measurement of the rate of reduction of the ergosterol C-7 double bond in cultured skin fibroblasts. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 761-768.
28. Bose HS, Sugawara T, Strauss JF, Miller WL. The pathophysiology and genetics of congenital lipid adrenal hyperplasia. *Acta Paediatr* 1996; 335: 1870-1878.
29. Anderson AJ, Stephan MJ, Walker WO, Kelley RI. Variant RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome with atypical sterol metabolism. *Am J Med Genet* 1998; 78: 413-418.
30. Anderson HC, Frenzt J, Martinez JE, Tuck-Muller CM, Bellizaire J. Adrenal insufficiency in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet* 1999; 82: 382-384.
31. Irons MB, Stewart TL, Sadeghi-Nejad AB. Cholesterol supplementation enhances growth of phallus in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Pediatr Res* 1998; 43(Supl 2): 78.