

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Deficiência de biotinidase: avaliação de uma amostra de pacientes
brasileiros com atividade reduzida da biotinidase**

Taciane Borsatto

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Porto Alegre
Março de 2014

INSTITUIÇÃO E FONTE FINANCIADORA

Esta dissertação é resultado do desenvolvimento de dois projetos de pesquisa relacionados entre si, ambos aprovados pela Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com base nos pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa e Serviço de Gestão em Pesquisa do HCPA (cartas de aprovação em Anexo I e II). O trabalho foi desenvolvido no laboratório *Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences* (BRAIN) localizado no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do HCPA.

Este trabalho teve auxílio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA, e bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, pela receptividade no seu grupo de pesquisa, confiança no meu trabalho, estímulo e exemplo de profissional ávida por testar suas hipóteses.

À Dra. Sandra Leistner-Segal, pela disponibilidade dos recursos do Laboratório de Genética Molecular e auxílio com questões laboratoriais.

À colaboradora Dra. Fernanda Sperb-Ludwig, por me auxiliar com o seu conhecimento prático nas questões laboratoriais e burocráticas, pelo estímulo quando eu desanimava devido às dificuldades das técnicas de biologia molecular, por ter se disponibilizado a me escutar a qualquer hora, por ser a única pessoa que conseguia me tranquilizar quando batia o desespero, enfim, pela amizade além do trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório BRAIN, Laboratório de Genética Molecular e Centro de Terapia Gênica, em especial à Isabel Bandeira, Andressa Bortoluzzi, Soraia Poloni, Aline Bochernitshan, Eduarda Rosa, Francyne Kubaski e Ana Carolina B. Facchin, por terem contribuído na minha adaptação ao funcionamento de cada laboratório, pela troca de experiências e pela companhia que tornou o dia-a-dia muito mais agradável.

Às colegas de grupo de pesquisa Tássia Tonon e Ana Paula Vanz, pelo auxílio com questões burocráticas, pela companhia em momentos tensos e alegres dessa jornada.

Aos funcionários do Serviço de Genética Médica, Centro de Pesquisa Experimental e PPG em Genética e Biologia Molecular, Dener C. de Abreu, Regis R. Guidobono, Everaldo B. de Almeida e Elmo Cardoso, por terem me auxiliado, cada um dentro de suas competências e com sua valiosa experiência, sempre atenciosos e prestativos.

Aos meus pais, pelo apoio, compreensão e carinho que não faltaram em mais esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

1	LISTA DE ABREVIATURAS	6
2	LISTA DE FIGURAS.....	7
3	LISTA DE TABELAS	8
4	RESUMO.....	9
5	ABSTRACT	11
6	INTRODUÇÃO	13
6.1	A biotinidase e o metabolismo da biotina.....	13
6.2	Deficiência de biotinidase	15
6.3	Manifestações clínicas.....	17
6.4	Bases moleculares da deficiência de biotinidase.....	18
6.4.1	A estrutura do gene <i>BTD</i> e da biotinidase.....	18
6.4.2	Variantes gênicas do <i>BTD</i>	19
6.4.3	Genótipo X fenótipo.....	20
6.5	Diagnóstico da deficiência de biotinidase	24
6.5.1	Triagem neonatal	24
6.5.2	Rastreamento familiar.....	26
6.5.3	Diagnóstico pré-natal e identificação de heterozigotos	26
6.5.4	Suspeita clínica	27
6.5.5	Fatores responsáveis por falso-positivos e falso-negativos	27
6.5.6	Exame complementar	29
6.5.7	Análise genética.....	29
6.6	Tratamento	29
7	JUSTIFICATIVA	32
7.1	Variabilidade no resultado do teste enzimático confirmatório	32
7.2	Iminente aumento de testes confirmatórios inconclusivos	33
7.3	Indisponibilidade da análise genética	35
8	HIPÓTESES.....	36
9	OBJETIVOS	37
9.1	Objetivo primário.....	37
9.2	Objetivos secundários.....	37
10	ARTIGO.....	38
11	DISCUSSÃO	61

12 PERSPECTIVAS	67
13 CONCLUSÕES	68
14 REFERÊNCIAS	70
15 ANEXOS	76
15.1 Anexo I.....	76
15.2 Anexo II.....	77
16 APÊNDICES.....	78
16.1 Apêndice I.....	78
16.2 Apêndice II.....	81
16.3 Apêndice III.....	84

1 LISTA DE ABREVIATURAS

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

BRAIN: Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences

CPE: Centro de Pesquisa Experimental

FIPE: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CoA: coenzima A

DB: deficiência de biotinidase

NV: nascidos vivos

Ex: éxon

Int: íntron

EUA: Estados Unidos da América

T: triagem neonatal

S: sintomáticos

PNTN: Programa Nacional de Triagem Neonatal

PABA: ácido para-aminobenzóico

PIG: pequenos para a idade gestacional

HPLC: High-performance liquid chromatography ou cromatografia líquida de alta eficiência

GAT: Grupo de Assessoramento Técnico

2 LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura química da biotina e da biocitina (biotina ligada à lisina)...13
- Figura 2. Os ciclos mostram a biotinidase atuando como hidrolase e transferase.....14
- Figura 3. Organização do gene que codifica a biotinidase (BTD), seu mRNA e enzima resultante.....18
- Figura 4. Resumo das bases moleculares da deficiência de biotinidase (DB)..20
- Figura 5. Ensaio quantitativo da biotinidase com amostra de soro e o substrato ácido biotínil-4-aminobenzóico, realizado no HCPA.....26
- Figura 6. Fluxograma proposto para o acompanhamento de recém-nascidos submetidos à triagem neonatal para DB.....31

3 LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência da deficiência de biotinidase em nível mundial, nacional e estadual.....16

Tabela 2. Variantes mais frequentes no gene *BTD*, encontradas em pacientes com DB total e parcial em dois estudos.....21

Tabela 3. Frequências alélicas (%) relatadas para as mutações c.98_104del7ins3, c.1612C>T, c.1368A>C, c.[511G>A;1330G>C] e c.1330G>C.....23

4 RESUMO

A deficiência de biotinidase (DB) é uma doença autossômica recessiva na qual estão prejudicadas tanto a obtenção da biotina a partir da dieta, quanto a reutilização da mesma, levando à deficiência de determinadas carboxilases dependentes de biotina. A DB pode ser total (atividade residual menor que 10%) ou parcial (10-30% da média da atividade normal) e heterozigotos apresentam atividade enzimática intermediária entre a dos afetados e a dos homozigotos normais. No Brasil, a frequência da DB combinada (DB total + DB parcial) parece ser uma das mais altas já relatadas, entre 1:6.843-1:62.500 nascidos vivos (incidência mundial estimada: 1:60.089 nascidos vivos). A idade do aparecimento das manifestações clínicas é variada, e essas incluem problemas neuropsicomotores, dermatológicos e metabólicos. O gene que codifica a biotinidase, *BTD*, é composto por quatro éxons, e alguns genótipos específicos apresentam uma boa associação com o nível de atividade enzimática. A confirmação da DB é baseada na medida da atividade da biotinidase no plasma, teste que pode ser falsamente reduzido devido à labilidade da enzima, prematuridade e icterícia, o que dificulta a classificação fenotípica e a decisão sobre instituição da terapia - suplementação oral de biotina livre. No final de 2012, a pesquisa da DB foi incluída no Programa Nacional de Triagem Neonatal, e, com a disponibilidade do exame pelo sistema público de saúde em todo o país, espera-se um aumento do número de crianças identificadas com atividade da biotinidase reduzida. O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil clínico e genético de uma amostra de pacientes brasileiros com atividade reduzida da biotinidase. O estudo foi observacional, multicêntrico e a amostragem foi por conveniência, sendo sequenciados os éxons 2, 3 e 4 do gene *BTD*. Foram incluídos 38 indivíduos com fenótipos bioquímicos definidos *a priori* a partir dos níveis de atividade da biotinidase em soro/plasma (deficiência total= 2; deficiência parcial= 9; heterozigotos= 15; limítrofe entre deficiência parcial e heterozigoto= 1; limítrofe entre heterozigoto e normal= 2) ou papel-filtro (n= 9, todos com tipo de deficiência não discriminada), a maioria proveniente da região sul do Brasil (n= 29/38) e identificados por triagem neonatal (n= 33/38). Consanguinidade parental foi relatada em dois casos. As variantes mais frequentemente encontradas nos

pacientes foram c.1330G>C (p.D444H), c.755A>G (p.D252G) e c.[1330G>C;511G>A] (p.[D444H;A171T]), cujas frequências alélicas foram 50%, 9,4% e 5,4%, respectivamente. Três novas variantes patogênicas foram identificadas (c.119T>C ou p.L40P, c.479G>A ou p.C160Y e c.664G>A ou p.D222N). Vinte e nove pacientes tiveram duas variantes patogênicas detectadas (em 26/29 o estado de *cis/trans* pode ser determinado), seis apenas uma variante e três nenhuma variante detectada. A genotipagem confirmou a classificação feita a partir da atividade enzimática em 16/26 casos. Em indivíduos controles, foram identificadas três variantes polimórficas, sendo duas não patogênicas (c.1171C>T ou p.P391S e c.1413T>C ou p.C471C, com frequência de 1,5% e 5,5%, respectivamente) e uma patogênica (c.1330G>C, com frequência de 4%). Os nossos dados sugerem que a DB parcial é o tipo mais comum de DB no Brasil, e ampliam a heterogeneidade alélica já descrita para essa doença.

Palavras-chave: deficiência de biotinidase; variantes genéticas; triagem neonatal; Brasil.

5 ABSTRACT

Biotinidase deficiency (BD) is an autosomal recessive disorder in which both absorption of biotin from dietary sources and its reuse/recycle are impaired, leading to a deficiency of biotin-dependent carboxylases. BD may be profound (residual activity <10%) or partial (10-30% of average normal activity), and heterozygous individuals have enzyme activity levels between those of affected patients and those of homozygous normal individuals. In Brazil, the overall frequency of BD (profound + partial) is among the highest ever recorded, with an estimated incidence of 1:6,843 to 1:62,500 newborns (NB) (estimated worldwide incidence: 1:60,089 NB). Clinical manifestations include neurological and dermatological abnormalities. The gene that codes for biotinidase, *BTD*, comprises four exons, and some genotypes correlate with the level of enzyme activity. The diagnosis of BD is confirmed by measurement of biotinidase activity in serum or plasma, but test results may be artifactually low due to enzyme lability, premature birth, and jaundice; this hinders both phenotypic classification and the decision to implement therapy, which consists of oral supplementation of free biotin. In late 2012, BD was included in the Brazilian Nationwide Neonatal Screening Program, and it is expected that, as testing becomes available through the public health care system throughout the country, the number of children diagnosed with low biotinidase activity will increase. This study sought to characterize the clinical and genetic profile of a sample of Brazilian patients with reduced biotinidase activity. This observational, multicenter study used a convenience sampling strategy, with sequencing of exons 2, 3, and 4 of the *BTD* gene. The sample comprised 38 individuals with biochemical phenotypes defined a priori on the basis of biotinidase activity in serum/plasma (2 with profound deficiency, 9 with partial deficiency, 15 heterozygous, 1 borderline between partial deficiency and heterozygosity, 2 borderline between heterozygous and normal) or in dried blood spot sample (n=9, all with unspecified deficiency). Most patients were from Southern Brazil (n= 29/38) and were identified by neonatal screening (n= 33/38). Parental consanguinity was reported in two cases. The most commonly found genetic variants were c.1330G>C (p. D444H), c.755A>G (p.D252G), and c.[1330G>C;511G>A] (p.[D444H;A171T]), with allele frequencies of 50%, 9.4%,

and 5.4% respectively. Three novel pathogenic variants were identified (c.119T>C or p.L40P, c.479G>A or p.C160Y, and c.664G>A or p.D222N). Twenty-nine patients had two pathogenic variants detected (with *cis/trans* configuration ascertained in 26/29), six had only one variant, and three had no pathogenic variants detected. Genotyping confirmed the original phenotypic classification based on enzyme activity in 16/26 cases. Three polymorphic variants were identified in control individuals, of which two were nonpathogenic (c.1171C>T or p.P391S and c.1413T>C or p.C471C, with a frequency of 1.5% and 5.5% respectively) and one pathogenic (c.1330G>C, frequency 4%). Our findings suggest that partial BD is the most common form of BD in Brazil, and expand current knowledge on the allelic heterogeneity of this condition.

Keywords: biotinidase deficiency; genetic variants; neonatal screening; Brazil.

6 INTRODUÇÃO

6.1 A biotinidase e o metabolismo da biotina

A biotina (figura 1), ou vitamina B₇, é uma vitamina hidrossolúvel essencial cuja ingestão adequada para adultos é de 30µg/dia (National Research Council, 1998). Humanos e outros mamíferos não são capazes de sintetizar a biotina, mas podem obtê-la de fontes exógenas: dieta e possivelmente microflora intestinal (ainda não está claro se a biotina bacteriana contribui para o estado de biotina do hospedeiro). Alimentos como fígado, rins, gema de ovo, alguns legumes e leite, representam importantes fontes dessa vitamina. As quantidades de biotina livre e biotina ligada à proteína (através de uma ligação amida com um resíduo de lisina) nos alimentos são variáveis (Combs, 2008).

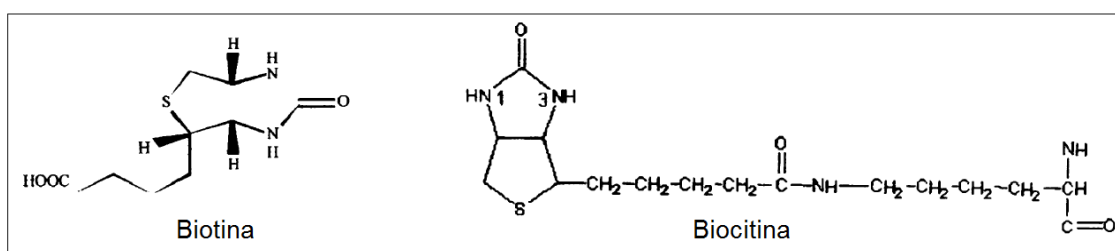


Figura 7. Estrutura química da biotina e da biocitina (biotina ligada à lisina). Adaptado de Said (2009).

A biotina ligada à proteína contida nos alimentos é digerida por proteases e peptidases gastrointestinais, gerando biocitina (biotinil-L-lisina) e pequenos peptídeos ligados à biotina (figura 2). A enzima biotinidase (EC 3.5.1.12), por sua vez, libera a biotina da biocitina e dos peptídeos, podendo então a biotina livre ser absorvida pelo intestino (Said, 2009).

A biotina atua como coenzima para as carboxilases: acetil-coenzima A (CoA) carboxilase (EC 6.4.1.2), propionil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.3), β-metilcrotonil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.4) e piruvato carboxilase (EC 6.4.1.1). Essas enzimas desempenham importantes funções na síntese de ácidos graxos, catabolismo das cadeias ramificadas de aminoácidos, e gliconeogênese. A biotina é ligada às apocarboxilases pela holocarboxilase

sintetase (EC 6.3.4.10), através de uma ligação amida com um resíduo de lisina específico (Hymes and Wolf, 1999, Wolf, 2003).

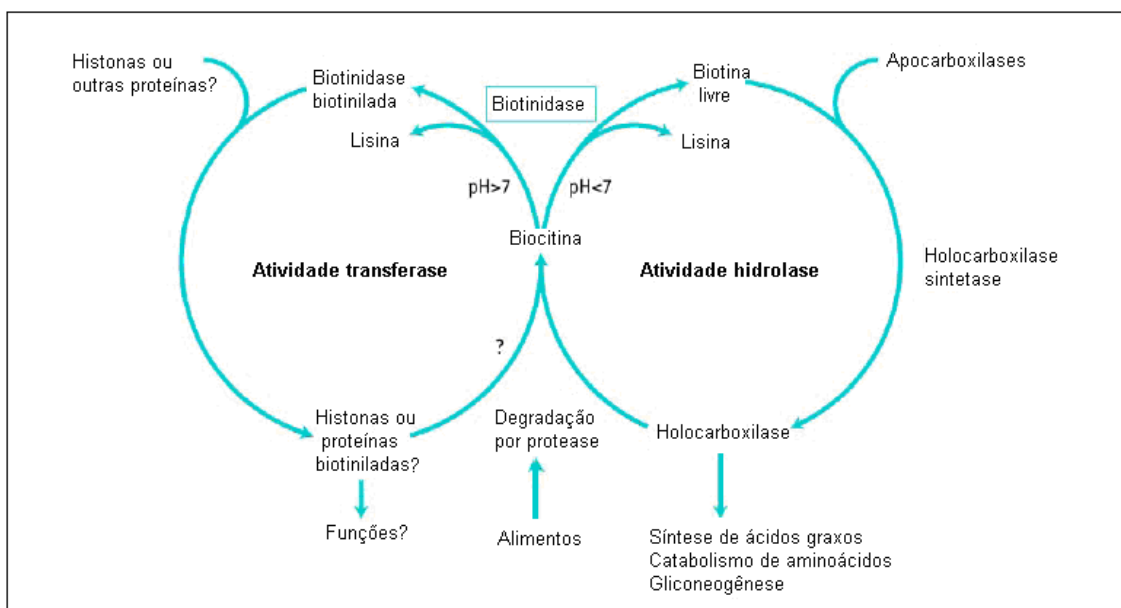


Figura 8. Os ciclos mostram a biotinidase atuando como hidrolase e transferase. Adaptado de Hymes and Wolf (1996).

No *turnover* das proteínas celulares, as holocarboxilases são degradadas gerando biocitina e oligopeptídeos biotilados. O passo final da degradação das carboxilases é catalisado pela biotinidase, que hidrolisa a biocitina gerando biotina livre, a qual pode ser novamente utilizada (Hymes and Wolf, 1996).

A biotinidase é uma das enzimas responsáveis pela homeostase da biotina, sendo fundamental na utilização e reutilização da vitamina. Foi verificada, por *Northern blot*, a presença de mRNA da biotinidase em diversos tecidos humanos: coração, placenta, fígado, pulmão, músculo esquelético, rins e pâncreas (Cole et al., 1994).

Além da atividade de hidrolase, essa enzima atua como carreadora de biotina e biotinil-transferase: a biotinidase transfere a biotina da biocitina para histonas (Chauhan and Dakshinamurti, 1986, Hymes et al., 1995, Hymes and Wolf, 1999). Estudos têm sugerido a participação da biotina na regulação da expressão de diversos genes (Rodriguez-Melendez and Zemleni, 2003), na

função imune (Baez-Saldana et al., 1998) e na proliferação celular (Zempleni and Mock, 2000).

6.2 Deficiência de biotinidase

Na década de 1940, foi observado que aves experimentais (*Gallus gallus domesticus*) alimentadas com clara de ovo crua desenvolviam dermatite e alopecia, condição que foi denominada *egg-white injury*. Esses animais se tornavam deficientes de biotina, apesar da disponibilidade da vitamina na dieta. Concluiu-se que algum componente da clara do ovo tornava a biotina da dieta indisponível (Eakin et al., 1940). Em seguida, foi isolada uma proteína da clara do ovo e foi confirmado que ela causava a deficiência de biotina, pois quando a dieta de clara de ovo crua de ratos era substituída por clara de ovo cozida (a proteína era inativada) o quadro de *egg-white injury* era revertido (Gyorgy et al., 1941). Mais tarde, tal proteína isolada da clara de ovo foi chamada de avidina. A avidina forma um complexo com a biotina impedindo a absorção da vitamina, pois esta precisa estar na forma livre para ser absorvida (Said, 2009).

A deficiência de biotina adquirida pode ocorrer em indivíduos com dieta que contém grandes quantidades de ovos crus (devido à grande quantidade de avidina neste alimento), e também em pacientes com alimentação parenteral prolongada sem suplementação de biotina (Wolf, 2012). São conhecidas duas doenças hereditárias em que a função da biotina como coenzima está prejudicada, levando à deficiência de carboxilases dependentes de biotina: a deficiência de holocarboxilase sintetase, e a deficiência de biotinidase (DB). Na deficiência de holocarboxilase sintetase, também conhecida como deficiência múltipla de carboxilases de início precoce, a ligação da biotina às apocarboxilases não é efetiva (Baumgartner and Suormala, 2012).

A DB, conhecida como deficiência múltipla de carboxilases de início tardio, é uma doença metabólica com padrão de herança autossômica recessiva, na qual a atividade da enzima biotinidase é deficiente. Essa deficiência acarreta dificuldade do organismo em usar a biotina fornecida pela dieta e fazer a reciclagem da mesma, havendo, conseqüentemente, perda de biocitina pela urina (Baumgartner and Suormala, 2012). O amplo espectro clínico dessa doença inclui problemas neurológicos, dermatológicos e metabólicos (Wolf et al., 1983b).

A DB pode ser total ou parcial conforme a atividade enzimática residual: a DB total é caracterizada por menos de 10% da média da atividade sérica normal da biotinidase, enquanto pacientes com DB parcial possuem entre 10-30% da média da atividade normal. Heterozigotos apresentam atividade enzimática intermediária entre a dos afetados e dos indivíduos homozigotos para o alelo selvagem (Wolf et al., 1983a).

Uma pesquisa de abrangência mundial (tabela 1) estimou que a incidência da DB parcial não difere muito da incidência da DB total, e que a incidência combinada de deficiência total e parcial é 1:60.089 nascidos vivos (NV) (Wolf, 1991). Até 2012, a triagem neonatal para DB não era disponibilizada na maioria dos estados brasileiros pelo sistema público de saúde, podendo, entretanto, ser realizada em laboratórios privados localizados principalmente na região sul e sudeste do país, fato que poderia estar contribuindo para o seu subdiagnóstico. Paradoxalmente, os estudos epidemiológicos existentes, baseados em diagnóstico por triagem neonatal, indicam que a frequência da DB combinada no Brasil pode ser uma das mais altas já relatadas, variando entre 1:6.843 e 1:62.500 NV (Pinto et al., 1998, Neto et al., 2004, Luz et al., 2008).

Tabela 1. Incidência da deficiência de biotinidase em nível mundial, nacional e estadual.

	DB combinada	DB parcial	DB total	Referências
No mundo	1:60.089 NV	1:129.282 NV	1:112.271 NV	Wolf (1991)
Brasil	1:9.000 NV	-	-	Neto et al. (2004)
EUA	-	1:31.000-1:40.000	1:80.000	Cowan et al. (2010)
Hungria (oeste)	1:18.700	1:23.000	1:97.000	Milankovics et al. (2010)
Paraná	1:62.500 NV	1:125.000 NV	1:125.000 NV	Pinto et al. (1998)
	1:6.843 NV	-	-	Luz et al. (2008)
Minas Gerais	-	1:18.289 NV	*	Lara (2010)

Todos os levantamentos foram realizados a partir de triagem neonatal.

DB= deficiência de biotinidase, NV= nascidos vivos.

- : dado não relatado.

* Não foram identificados casos de DB total.

6.3 Manifestações clínicas

Os sinais e sintomas da DB total podem aparecer entre 1 semana e 10 anos de idade, com uma média de 3,5 meses (Wolf, 2012). Crianças com DB total não tratadas com biotina apresentam uma ou mais das seguintes manifestações clínicas, as quais são também observadas em crianças em outras doenças metabólicas herdadas: erupção cutânea eczematosa (*rash cutâneo*), alopecia, infecções recorrentes, convulsões, hipotonia, ataxia, retardo no desenvolvimento, problemas respiratórios (como hiperventilação, apneia, estridor laríngeo), visuais e auditivos (Wolf et al., 1983b). Se o tratamento não é iniciado em tempo, há risco de danos irreversíveis (como perda auditiva, visual e deficiência intelectual), de coma e de morte (Wastell et al., 1988, Bay et al., 2010).

Os achados oftalmológicos incluem infecções, distúrbios de visão e motilidade, alterações pigmentares da retina, sendo que os mais comumente relatados são atrofia óptica e ceratoconjuntivite (Salbert et al., 1993). Aproximadamente 75% das crianças sintomáticas não tratadas com DB total têm perda auditiva neurosensorial (Wolf et al., 2002a).

As alterações bioquímicas que podem aparecer são acidose cetolática e acidúria orgânica, mas nem todos os pacientes apresentam tais alterações. A DB deve ser considerada em qualquer criança com algum dos achados neurológicos ou cutâneos citados anteriormente, com ou sem acidose metabólica ou acidúria orgânica (Wolf et al., 1983b, Wastell et al., 1988).

Alguns pacientes começam a apresentar manifestações clínicas mais tardiamente, no final da infância ou adolescência. Nesses casos, os sintomas são fraqueza muscular, paresia espástica, perda da visão e escotomas (Wolf et al., 1998, Baykal et al., 2005).

Praticamente todas as crianças com DB total se tornam ou tem o risco de se tornarem sintomáticas se não tratadas. Curiosamente, foram identificados alguns pais e irmãos de crianças com DB, diagnosticadas através de triagem neonatal, que possuem DB total ou parcial (confirmada por análise genética) e que são assintomáticos. Não está bem esclarecido por que alguns adultos permanecem assintomáticos mesmo que nunca tratados (Wolf et al., 1997, Baykal et al., 2005).

Crianças com DB parcial não tratadas podem exibir qualquer um dos sintomas descritos anteriormente, entretanto, os sintomas são normalmente mais leves e surgem apenas quando a criança passa por um período de estresse, como uma infecção prolongada ou alimentação inadequada (McVoy et al., 1990).

6.4 Bases moleculares da deficiência de biotinidase

6.4.1 A estrutura do gene *BTD* e da biotinidase

A figura 3 mostra a estrutura do gene que codifica a biotinidase, chamado *BTD*, do mRNA e da enzima. O gene *BTD* localiza-se no braço curto do cromossomo 3 (3p25), é composto por quatro éxons e três íntrons abrangendo pelo menos 23kb e é um *housekeeping gene* (Cole et al., 1994, Knight et al., 1998). Há evidência de pelo menos um *splice* alternativo no éxon 1 (Stanley et al., 2004).

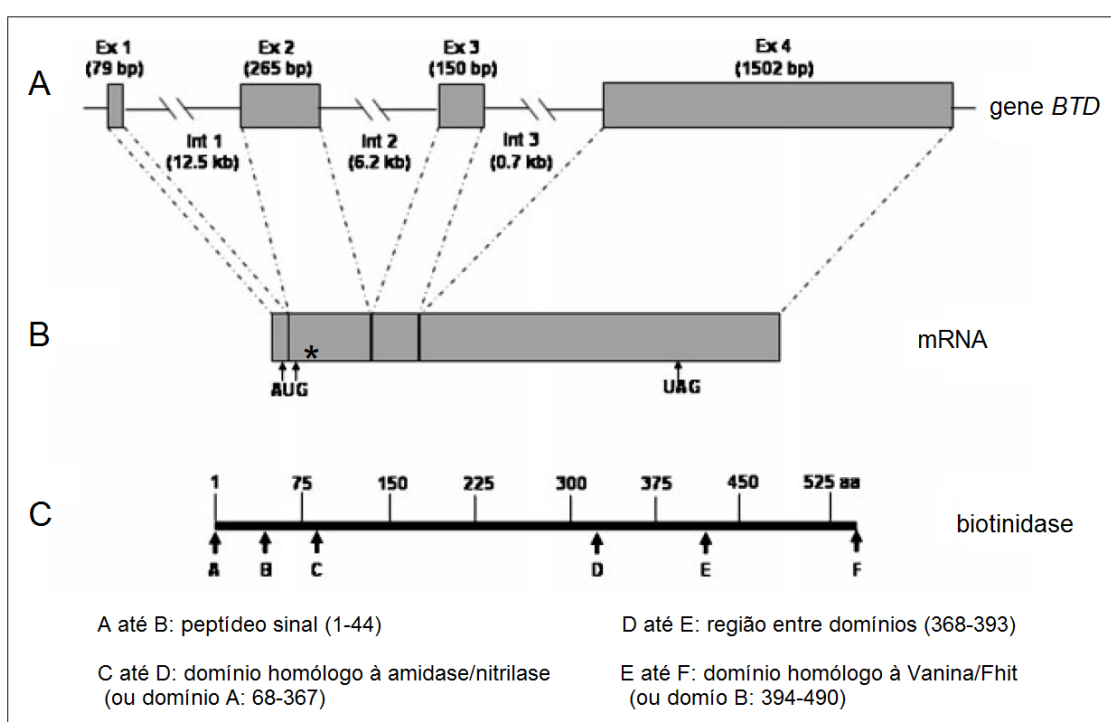


Figura 9. Organização do gene que codifica a biotinidase (*BTD*), seu mRNA e enzima resultante. A: O gene *BTD* consiste em quatro éxons (Ex) e três íntrons (Int). B: O mRNA apresenta dois sítios de início de tradução putativos (AUG), um no éxon 1 e outro no éxon 2, e um códon de parada no éxon 4 (UAG). O asterisco indica a posição correspondente ao N-terminal da proteína madura. Assumindo que o primeiro códon AUG é utilizado, o mRNA codifica um peptídeo de 543 aminoácidos. C: Esquema da estrutura da enzima biotinidase mostrando as regiões correspondentes à peptídeo sinal, domínio A, região de conexão e domínio B. Adaptado de Pindolia et al. (2010).

O mRNA apresenta dois potenciais códons de início de tradução (AUG), o primeiro no éxon 1 e o segundo no éxon 2. Se o primeiro códon for utilizado, um peptídeo sinal de 41 aminoácidos é codificado, mas se a tradução começar a partir do segundo, o peptídeo sinal terá 21 aminoácidos. Acredita-se que o segundo códon, mais conservado, seja preferido ou o único a ser utilizado (Pindolia et al., 2010). O peptídeo sinal maior possui motivos consenso que podem direcionar a biotinidase para mitocôndria ou retículo endoplasmático, enquanto que o peptídeo sinal menor sinaliza apenas pra retículo endoplasmático e melhor coincide com o motivo da maioria dos peptídeos sinal de secreção (Stanley et al., 2004).

A biotinidase é composta por 543 aminoácidos e possui seis sítios de N-glicosilação putativos. A estrutura tridimensional da enzima, predita por modelagem computacional, apresenta dois domínios: o domínio A, homólogo à nitrilases/amidases, onde fica a tríade catalítica (glutamato 112, lisina 212 e cisteína 245); e o domínio B, homólogo ao domínio de ancoragem da Vanina-1 e domínio Fhit da NitFhit, possivelmente envolvido com a ligação à biotina. Além disso, há uma região aparentemente flexível que conecta o domínio A e o domínio B (Pindolia et al., 2007).

6.4.2 Variantes gênicas do *BTD*

No banco de dados público do *ARUP Laboratories*, disponível em http://www.arup.utah.edu/database/BTD/BTD_display.php (Procter et al., 2013), já foram relatadas 168 variantes do gene *BTD*, das quais a maioria é considerada patogênica. Nove alterações são consideradas benignas, são elas: c.1-34C>T, c.99C>T (p.C33C), c.211C>T (p.L71L), c.234C>T (p.S78S), c.444C>A (p.A148A), c.460-7_8insT, c.645C>T (p.L215L), c.1171C>T (p.P391S) e c.1413T>C (p.C471C). Apesar da variante c.1171C>T (p.P391S) causar a substituição de um aminoácido na cadeia proteica da biotinidase, ela foi considerada benigna porque o indivíduo na qual ela foi encontrada (em heterozigose) possuía atividade da biotinidase normal (Hymes et al., 2001). As demais variantes são silenciosas, ou seja, ocorre alteração de nucleotídeo mas isso não resulta em mudança na sequência de aminoácidos da proteína.

Pacientes com DB apresentam alterações na sequência nucleotídica ao longo da região codificante e junções éxon-íntron do gene *BTD*, com exceção

do éxon 1. Alterações no éxon 1 provavelmente são toleradas uma vez que a tradução do mRNA pode iniciar no éxon 2, mas em vários estudos que realizaram sequenciamento completo do gene em pacientes com DB nenhuma alteração no éxon 1 foi encontrada (Muhl et al., 2001, Wolf et al., 2002b, Ye et al., 2009, Iqbal et al., 2010). Nos demais éxons, foram descritas variantes de diferentes classes: sentido trocado, sem sentido, deleção ou inserção de um ou mais nucleotídeos, alteração em sítio de *splice* e mutação alélica composta. As variantes do tipo sentido trocado são predominantes (Pindolia et al., 2010).

A prevalência estimada de heterozigotos para variantes no gene *BTD* é de 1:123 indivíduos (Wolf, 1991).

6.4.3 Genótipo X fenótipo

Pouco se sabe sobre correlações entre genótipo e manifestações clínicas na DB. Há um relato de que crianças com variantes nulas teriam mais chance de desenvolver perda auditiva do que crianças com variantes do tipo sentido trocado (Sivri et al., 2007). Entretanto, certos genótipos estão correlacionados com DB total e outros com DB parcial.

Deficiência TOTAL	Deficiência PARCIAL	Não afetado		
alelo da deficiência total +	alelo da deficiência total +	alelo c.1330G>C +	alelo da deficiência total ou alelo c.1330G>C +	alelo normal +
alelo da deficiência total	alelo c.1330G>C	alelo c.1330G>C	alelo normal	alelo normal

Figura 10. Resumo das bases moleculares da deficiência de biotinidase (DB). A DB total e DB parcial são caracterizadas por menos de 10% e entre 10-30% da média da atividade enzimática normal, respectivamente. Homozigotos para c.1330G>C (p.D444H) apresentam atividade semelhante à de heterozigotos para alelo de deficiência total. Heterozigotos para c.1330G>C (p.D444H) apresentam atividade semelhante à de indivíduos homozigotos para o alelo selvagem.

A figura 4 esquematiza o que já se conhece sobre a associação entre genótipo e fenótipo. A maioria das variantes no gene *BTD* causa perda completa ou quase completa da atividade da enzima biotinidase; são chamados alelos da deficiência total de biotinidase. A presença de dois desses alelos, na forma homozigota ou heterozigota composta, resulta em DB total.

Nessa situação, o indivíduo está susceptível a desenvolver manifestações clínicas se não for tratado. Já, indivíduos com um alelo da deficiência total de biotinidase e outro alelo normal, são carreadores da doença, e não necessitam de tratamento (Wolf, 2000 [Updated 2013 Dec 5]).

A análise genética de 92 pacientes com DB total (33 identificados clinicamente e 59 por triagem neonatal), realizada nos Estados Unidos da América (EUA), revelou quatro variantes mais comuns entre eles, as quais são responsáveis por aproximadamente 60% dos alelos anormais encontrados (tabela 2). As variantes c.98_104del7ins3 e c.1612C>T (p.R538C) são as mais frequentes nos indivíduos sintomáticos e c.1368A>C (p.Q456H) e c.[511G>A;1330G>C] (p.[A171T;D444H]), são as mais comuns entre as crianças triadas (Norrsgard et al., 1999).

Tabela 2. Variantes mais frequentes no gene *BTD*, encontradas em pacientes com DB total e parcial em dois estudos.

Forma da DB	Alteração no cDNA	Localização no cDNA	Efeito	Frequência alélica em pacientes sintomáticos	Frequência alélica em pacientes da triagem neonatal
Total ¹	c.98_104del7ins3	Ex2	<i>frame shift</i>	35,5%	12,5%
	c.1612C>T	Ex4	p.R538C	22%	3%
	c.1368A>C	Ex4	p.Q456H	Não ocorreu	28%
	c.[511G>A;1330G>C]	Ex4; Ex4	p.[A171T;D444H]	Não ocorreu	17%
Parcial ²	c.1330G>C	Ex4	p.D444H	-	47%

DB = deficiência de biotinidase, Ex = éxon, *frame shift* = troca de fase de leitura.

¹ Norrgard et al. (1999), 92 pacientes (33 sintomáticos e 59 da triagem neonatal).

² Swango et al. (1998), 19 pacientes da triagem neonatal.

A caracterização genética de 19 pacientes com DB parcial, identificados por triagem neonatal nos EUA e outros países, demonstrou que quase todos os indivíduos têm a variante c.1330G>C (p.D444H) em um alelo do gene *BTD* (tabela 2) em combinação com uma variante para deficiência total no outro alelo. Crianças com DB parcial não desenvolvem sintomas até que passem por uma situação de estresse (infecção prolongada, por exemplo), e isso justifica o

tratamento precoce. Espera-se que indivíduos homozigotos para a variante p.D444H tenham aproximadamente 45-50% da média da atividade sérica normal da biotinidase, o que é similar à atividade dos heterozigotos para DB total (figura 4). Tais indivíduos não necessitam de tratamento (McVoy et al., 1990, Swango et al., 1998). A variante p.D444H em combinação com uma variante de deficiência total no mesmo alelo, em configuração *cis*, resulta em um alelo de deficiência total de biotinidase.

Estudos que descrevem as variantes gênicas na DB também têm sido publicados em diversos outros países, cada qual com as suas particularidades. A partir da tabela 3, pode-se inferir que a alta frequência do alelo p.D444H nos pacientes do Brasil (Neto et al., 2004) e Hungria (Milankovics et al., 2010) deve-se à inclusão de pacientes com a forma parcial da deficiência. Apenas na Áustria (Moslinger et al., 2003) esse alelo foi detectado entre pacientes com deficiência total, o que é questionável, uma vez que somente um indivíduo apresentou tal variante e a sua atividade enzimática é limítrofe entre deficiência total e parcial (9%). No estudo realizado na Turquia (Pomponio et al., 2000a), foi observado que a variante c.1368A>C (p.Q456H) pode levar ao aparecimento de sintomas, ao contrário do que se acreditava anteriormente, com o estudo norte-americano (Norrgard et al., 1999). Além disso, a alta frequência de casamentos consanguíneos na Arábia Saudita exerce um efeito notório nas frequências alélicas, pois apenas uma das variante comuns nas outras populações aparece nesses pacientes, e todos os indivíduos do estudo são homozigotos (Pomponio et al., 2000b).

Visto que os diversos alelos da deficiência total ocorrem com frequências diferentes entre os países, algumas vezes sendo únicos em determinadas populações, é importante conhecer o perfil genético da população-alvo quando se quer aplicar a análise genética para o diagnóstico da DB.

Tabela 3. Frequências alélicas (%) relatadas para as mutações c.98_104del7ins3, c.1612C>T, c.1368A>C, c.[511G>A;1330G>C] e c.1330G>C

País	Tipo de amostra (n ^d)	c.98_104del7ins3 (%)	c.1612C>T (p.R538C) (%)	c.1368A>C (p.Q456H) (%)	c.[511G>A;1330G>C] (p.[A171T;D444H]) (%)	c.1330G>C (p.D444H) (%)	Referência
Brasil ^a	T (13)	15,4	0	0	11,5	38,5	Neto et al. (2004)
Hungria ^a	T (57)	7,5	5	14	10	40	Milankovics et al. (2010)
EUA e outros ^b	T (19)	8	5	13	10,5	47	Swango et al. (1998)
EUA ^c	T (59)	12,5	3	28	17	0	Norrgard et al. (1999)
	S (33)	35,5	22	0	0	0	
Turquia ^c	T (15)	9	0	13,6	13,6	0	Pomponio et al. (2000a)
	S (13)	37,5	6	12,5	0	0	
Áustria ^c	T (15)	23	0	26,6	3	3	Moslinger et al. (2003)
Arábia Saudita ^c	S (08)	12,5	0	0	0	0	Pomponio et al. (2000b)
Hungria ^c	*	12,5	8	23,5	17	0	Milankovics et al. (2010)

DB = deficiência de biotinidase, T = triagem neonatal, S = sintomáticos.

^a Entre pacientes com DB, incluindo as duas formas da deficiência: parcial e total.

^b Entre pacientes com DB parcial, apenas.

^c Entre pacientes com DB total, apenas.

^d O n (tamanho amostral) apresentado aqui não é o n total dos estudos, mas os pacientes que tiveram DB confirmada por análise genética.

* Dado não relatado.

6.5 Diagnóstico da deficiência de biotinidase

Indivíduos com DB podem ser identificados antes do aparecimento dos sintomas por triagem neonatal ou por rastreamento familiar - em ambos os casos através da medida da atividade enzimática da biotinidase plasmática. Também é possível, embora incomum, realizar o diagnóstico pré-natal da DB e a identificação de heterozigotos. O diagnóstico em indivíduos sintomáticos é obtido por meio de exame clínico e pela medida da atividade enzimática. Além disso, a análise de ácidos orgânicos na urina pode ser complementar. A análise genética pode ser realizada em última instância para confirmação do diagnóstico.

6.5.1 Triagem neonatal

Na década de 80, Wolf et al. (1983a) desenvolveram um método para determinação da atividade da biotinidase plasmática e demonstraram que indivíduos com deficiência múltipla de carboxilases de início tardio apresentavam atividade da biotinidase reduzida, ou seja, que a deficiência de biotinidase era o defeito bioquímico primário. Em seguida, foi desenvolvido um método para triagem neonatal da DB, o qual avalia colorimetricamente a atividade da biotinidase em sangue impregnado em papel-filtro (Heard et al., 1984). Esse método foi utilizado pela primeira vez em 1984 em um programa de triagem neonatal piloto na Virgínia (EUA). Com esse programa piloto verificou-se que a DB era tão frequente quanto outras condições para as quais já se realizava triagem (Heard et al., 1986). Poucos anos depois, 36 programas espalhados pelo mundo (14 países) já haviam incluído a triagem para DB (Wolf, 1991).

No Brasil, a triagem para DB foi incluída no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) em 2012 (Portaria nº 2829/GM/MS de 14.12.12) e está sendo oferecida por serviços públicos, além dos serviços privados. O Grupo de Assessoramento Técnico do PNTN considerou que a DB preenche os critérios revisados de Wilson & Jungner para ser incluída na triagem neonatal: os pacientes afetados não mostram sinais clínicos neste período da vida, é uma doença com alta morbidade e mortalidade, possui um tratamento simples e efetivo que modifica a história natural da doença, e não é extremamente rara (Pollitt et al., 1997, GAT-PNTN, 2012).

A forma mais comum de triagem neonatal para DB é a determinação qualitativa ou semiquantitativa da atividade da biotinidase por teste colorimétrico, utilizando sangue seco impregnado em papel-filtro. Em crianças que tiveram o resultado da triagem alterado é necessário realizar o teste confirmatório, que é a determinação quantitativa da atividade da biotinidase em amostra de plasma ou soro. O mesmo ensaio deve ser feito com amostra dos pais e de um indivíduo não relacionado, para ajudar na interpretação. Os pais são referências de heterozigotos e o indivíduo não relacionado é útil como controle para distinguir a verdadeira DB de uma diminuição da atividade devido a artefatos de manipulação da amostra (Cowan et al., 2010).

O método mais difundido para medida quantitativa da atividade da biotinidase (atividade biotinil-hidrolase) é a determinação colorimétrica da liberação de ácido 4-aminobenzóico (também conhecido como ácido *para*-aminobenzóico ou PABA) do ácido biotinil-4-aminobenzóico, um substrato análogo da biocitina. Resumidamente, a amostra de soro é incubada com o substrato artificial ácido biotinil-4-aminobenzóico a 37°C por 30 minutos, período em que a biotinidase presente no soro libera PABA livre, e após, a reação é parada com ácido tricloroacético. O PABA liberado sofre diazotização com nitrito de sódio e o excesso desse reagente é removido com sulfamato de amônio. Por fim, o PABA diazotizado reage com dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina formando um produto de cor púrpura, o qual é mensurado espectrofotometricamente a 546 nm. A absorbância é diretamente proporcional à quantidade de PABA liberado, o qual, por sua vez, é diretamente proporcional à atividade da biotinidase na amostra (Wolf et al., 1983a). O resultado é dado em nmol de PABA/min/mL de plasma. O princípio do método de triagem é o mesmo; as amostras que se tornam púrpura apresentam atividade de biotinidase, e aquelas que não adquirem cor considera-se que tem pouca ou nenhuma atividade.

A figura 5 mostra a etapa final do ensaio quantitativo da biotinidase realizado no Laboratório de Referência para Erros Inatos do Metabolismo do HCPA. Observam-se amostras com diferentes intensidades de cor, o que significa que possuem diferentes níveis de atividade da biotinidase.

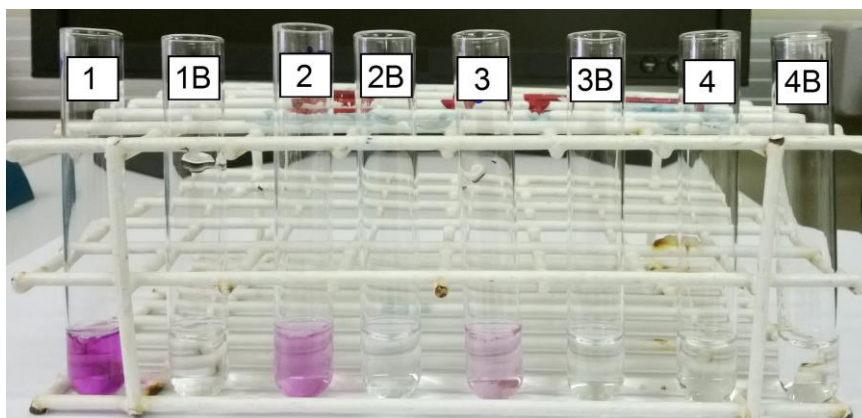


Figura 11. Ensaio quantitativo da biotinidase com amostra de soro e o substrato ácido biotínil-4-aminobenzóico, realizado no HCPA. Ao lado direito das amostras, tubos 1-4, estão os respectivos brancos (1B-4B). De acordo com a absorbância a 546 nm, as amostras 1, 2, 3 e 4 possuem atividade da biotinidase normal, atividade compatível com heterozigoto, DB parcial e DB total, respectivamente.

Existem outros métodos para medida da atividade da biotinidase que empregam diferentes substratos, como biotínil-6-aminoquinolina (Wastell et al., 1984), biocitina (Kumasaka et al., 2001), e análogos biotínilados radioisotópicos (Livaniou et al., 1997), mas são mais caros, de difícil execução, e não são facilmente adaptáveis às amostras de sangue em papel-filtro (Cowan et al., 2010).

6.5.2 Rastreamento familiar

Outra maneira de detectar indivíduos com doença é o rastreamento familiar. Os irmãos de crianças com DB, que nunca foram testados para a doença, devem ser rastreados quanto à atividade enzimática no soro, mesmo não apresentando manifestações clínicas, pois possuem risco de ter a deficiência e virem a ser sintomáticos (Baykal et al., 2005).

6.5.3 Diagnóstico pré-natal e identificação de heterozigotos

O diagnóstico pré-natal da DB é possível pela determinação da atividade da biotinidase a partir de cultura de células do líquido amniótico, ou por análise de DNA obtido diretamente do líquido amniótico ou de células do líquido amniótico. Solicitações de diagnóstico pré-natal não são comuns, já que os sintomas da DB podem ser facilmente prevenidos com o diagnóstico e tratamento precoce (Pomponio et al., 1998).

Indivíduos heterozigotos para uma variante patogênica no gene *BTD* não correm risco de desenvolver sintomas e podem ser identificados por possuírem atividade enzimática intermediária entre os afetados e os indivíduos que possuem apenas alelos selvagens (Wolf et al., 1983a).

A análise genética para diagnóstico pré-natal ou pesquisa de heterozigotos pode ser realizada quando as variantes causadoras da doença em um membro da família afetado são previamente conhecidas (Wolf, 2012).

6.5.4 Suspeita clínica

Algumas crianças com DB são paucissintomáticas, enquanto que outras têm diversos achados neurológicos, cutâneos ou bioquímicos, como já apresentado no item "4.3 Manifestações clínicas". As manifestações neurológicas mais comuns em indivíduos com DB total não tratados são convulsões e hipotonia. Muitas crianças sintomáticas apresentam várias anormalidades no sistema nervoso central vistas em imagens de ressonância magnética ou tomografia computadorizada (Wolf, 2012).

Quando os médicos suspeitam de DB a partir das características clínicas do paciente, é solicitado o teste da atividade enzimática em plasma/soro descrito em "4.5.1 Triagem neonatal", que é capaz de identificar a condição.

6.5.5 Fatores responsáveis por falso-positivos e falso-negativos

A biotinidase é uma enzima lábil, cuja atividade pode diminuir em condições de umidade, temperatura elevada e ao longo do tempo. Testes de triagem neonatal falso-positivos ocorrem comumente quando os cartões saturados com sangue são colocados em envelopes antes de estarem suficientemente secos. Isso ocorre porque a umidade resulta em perda significativa da atividade da enzima (Cowan et al., 2010). Quando a atividade da biotinidase foi avaliada em amostras de plasma e de sangue em papel-filtro sob várias temperaturas (de -20°C a 37°C) e ao longo do tempo, verificou-se que o tempo e temperaturas mais elevadas levam à diminuição estatisticamente significativa da atividade da biotinidase (Schulte, 2003).

Também já foi constatado que a atividade de biotinidase apresenta correlação direta com a idade gestacional. Durante o primeiro e o terceiro dias de vida, as atividades estavam abaixo do considerado normal para adultos em

todos os 64 recém-nascidos estudados (prematturos e a termo). Em 56 deles, os níveis foram subindo gradativamente e atingiram o nível normal de adultos entre o 4^o-40^o dias de vida. Por outro lado, em oito pré-termos a atividade de biotinidase reduziu durante o 3^o-7^o dias de vida, e foi atingir o nível normal de adultos entre o 20^o-40^o dias de vida. Alteração da função hepática foi excluída como causa para esse achado, e a substituição da síntese de um tipo de molécula enzimática (fetal) por outro (adulto) ou um período de alimentação insuficiente foram sugeridos como possíveis justificativas. Entre o 4^o e 6^o dia de vida (períodos que coincide com a coleta da amostra para triagem neonatal), 8 dos 48 pré-termos ou pequenos para idade gestacional apresentaram atividade da biotinidase entre 4,7-26% da média dos valores de adultos saudáveis, e teriam testes com resultados falso-positivos durante a triagem neonatal (Suormala et al., 1988).

Com o objetivo de esclarecer a questão dos falso-positivos na triagem neonatal para DB, Schulpis et al. (2003) avaliaram a atividade da biotinidase no soro de recém-nascidos a termo, prematturos e pequenos para a idade gestacional (PIG) com icterícia e controles (bilirrubina total entre 1-4 mg/dL). No grupo de controles, a atividade da biotinidase nos prematturos ($3,3 \pm 1,2$ nmol/min/mL) e PIG ($3,34 \pm 0,8$ nmol/min/mL) foi menor do que a atividade nos nascidos a termo ($4,99 \pm 1,1$ nmol/min/mL, $p < 0,001$). Os níveis de bilirrubina total e enzimas hepáticas mostraram correlação inversa com a atividade da biotinidase em todos os recém-nascidos icterícos do estudo ($p < 0,0001$). *In vitro*, foi verificada uma inibição 50% da atividade enzimática depois da pré-incubação com 10 e 15 mg/dL de bilirrubina. Por fim, os autores sugerem que a diminuição da atividade da biotinidase em icterícos pode ser devido ao comprometimento da função hepática e que a bilirrubina total em altas concentrações pode atuar como inibidor da biotinidase.

Quando é utilizado o ensaio com o substrato biotinil-6-aminoquinolina, resultados falso-positivos podem ocorrer se o indivíduo tem uma concentração elevada de triglicerídeos. Níveis de albumina acima do normal, uso de certos antibióticos e ácido valpróico podem interferir no teste causando resultados falso-negativos (bula Neonatal biotinidase kit, PerkinElmer, 2011). A presença de interferentes que causam resultados falso-negativos deve ser testada

executando um ensaio livre de substrato para cada amostra de paciente (se não houver interferente, não desenvolverá cor/fluorescência) (Cowan et al., 2010).

6.5.6 Exame complementar

Os ácidos orgânicos na urina às vezes estão anormais em pacientes com DB como resultado da deficiência múltipla de carboxilases, mas muitos pacientes com a doença têm resultados normais. Além disso, a elevação de ácidos orgânicos que ocorre na DB também ocorre em outras condições ou doenças. Portanto, essa abordagem não é apropriada como o único teste em indivíduos suspeitos de DB, é apenas complementar ao teste da atividade da biotinidase (Wolf et al., 1983b, Baumgartner and Suormala, 2012).

6.5.7 Análise genética

A confirmação da DB por análise do DNA (isolado de leucócitos, fibroblastos, ou de sangue coletado em papel-filtro), pode ser útil em alguns casos. A análise genética é particularmente importante na diferenciação de indivíduos com DB total daqueles com DB parcial e, de indivíduos com DB parcial dos que são heterozigotos, quando testes enzimáticos repetidos são discordantes (Cowan et al., 2010).

Existem diferentes estratégias de genotipagem para DB. Pode ser realizada a pesquisa direcionada de variantes mais frequentes na população alvo, sequenciamento do gene da biotinidase e análise de deleções/duplicações (embora não tenham sido relatadas grandes alterações no gene *BTD*). A pesquisa direcionada de variantes é mais barata do que o sequenciamento completo do gene, mas não é capaz de detectar variantes menos comuns (Wolf, 2012).

6.6 Tratamento

Os indivíduos com DB total devem ser tratados com suplementação oral de biotina livre (em dose farmacológica, muito maior do que a ingesta normalmente necessária), ao longo de toda vida, independente do seu genótipo. A dose farmacológica de biotina varia entre 5-20mg/dia. Indivíduos com DB parcial começaram a ser identificados quando a triagem neonatal para DB foi iniciada; até aquele momento não havia relatos de indivíduos sintomáticos que apresentassem atividade entre 10-30% da média normal, e,

portanto, não se tinha conhecimento sobre a necessidade de tratá-los. Com o passar dos anos, o surgimento de relatos de indivíduos com DB parcial não tratados que desenvolveram sintomas fez com que decisões mais cautelosas passassem a ser tomadas. O tratamento da DB parcial ainda é controverso, e alguns autores recomendam o tratamento com biotina, entre 1-5mg/dia, nesse caso (McVoy et al., 1990, Wolf, 2010).

De modo que o tratamento consiste em suplementação com o substrato biotina, a quantidade de enzima não é alterada. Mesmo que a criança esteja consumindo doses farmacológicas de biotina, isso não irá afetar o teste de atividade enzimática (portanto, novos testes podem ser realizados após início do tratamento na necessidade de confirmação do diagnóstico) (Wolf, 2010).

Embora a atrofia óptica, a perda auditiva e o retardo no desenvolvimento não sejam revertidos com a reposição de biotina, as crianças mostram melhora quanto aos outros sintomas depois que começam o tratamento. Além disso, crianças com DB identificadas por triagem neonatal têm os sintomas prevenidos com a terapia (Wastell et al., 1988, Wolf, 2010).

O Grupo de Assessoramento Técnico (GAT) do PNTN recomenda iniciar o tratamento após dois testes de triagem alterados e realizar o teste quantitativo aos 3 meses de idade para os nascidos a termo, conforme o fluxograma mostrado na figura 6. Para recém-nascidos prematuros, o GAT recomenda iniciar o tratamento após dois testes de triagem alterados, realizar o terceiro teste em papel-filtro quando a criança completar a idade gestacional corrigida para o termo (mínimo de 37 e máximo de 41 semanas de idade gestacional corrigida) e, se o resultado for alterado, realizar o teste quantitativo três meses após a coleta da terceira amostra em papel-filtro ou quando a criança completar três meses de idade corrigida. Nos recém-nascidos que necessitem receber transfusão de hemoderivados, deve-se realizar a coleta de sangue em papel-filtro previamente à transfusão, se possível; caso a transfusão já tenha sido realizada, aguardar 90 dias para realizar a coleta; em crianças que tiveram primeira coleta com resultado alterado e que receberam ou que necessitem de transfusão de hemoderivados anterior à segunda coleta, deve-se iniciar o tratamento com biotina e postergar a segunda coleta para 90 dias após a última transfusão (GAT-PNTN, 2012).

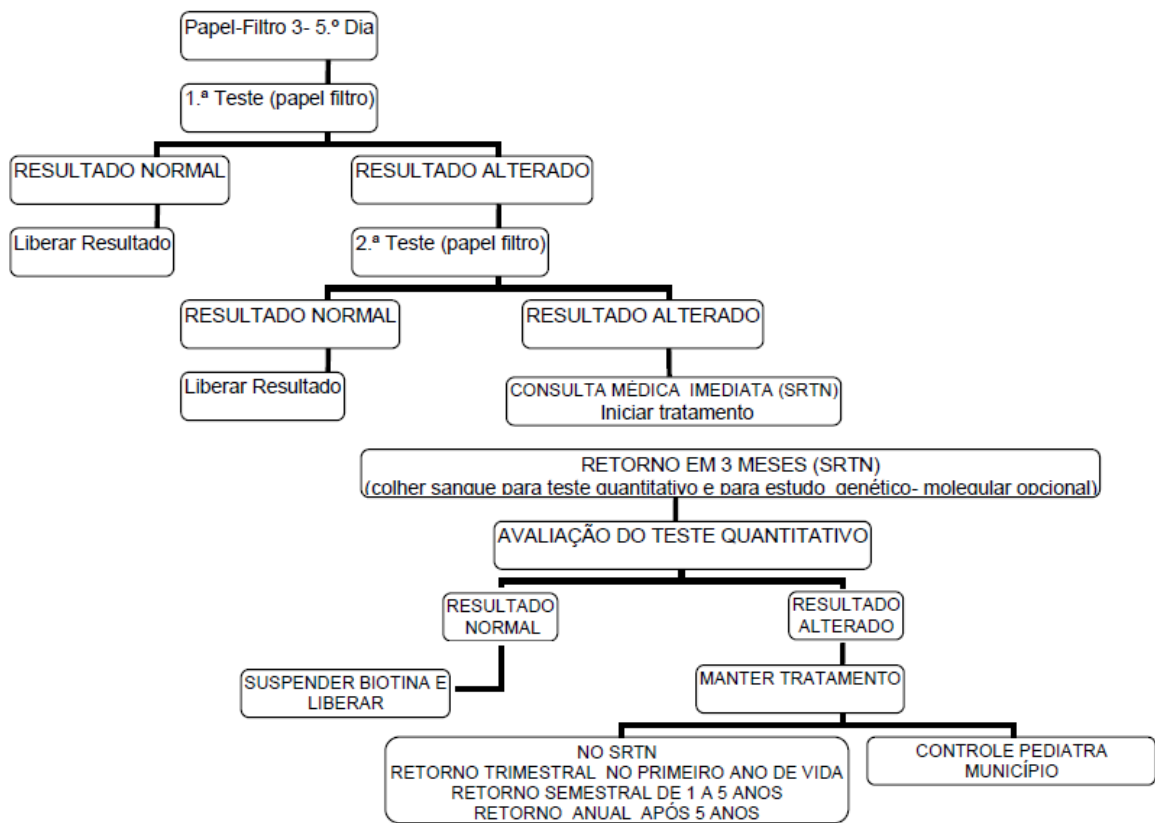


Figura 12. Fluxograma proposto para o acompanhamento de recém-nascidos submetidos à triagem neonatal para DB (GAT-PNTN, 2012). SRTN, Serviço de Referência em Triagem Neonatal.

7 JUSTIFICATIVA

O tratamento da DB é simples e eficaz quando instituído precocemente, entretanto o diagnóstico pode apresentar alguns obstáculos. Neste capítulo serão abordados problemas envolvendo o diagnóstico da DB, sendo que o primeiro não ocorre exclusivamente no Brasil: a variabilidade no resultado do teste enzimático confirmatório (teste de diagnóstico), o iminente aumento do número de testes confirmatórios com resultados inconclusivos e a indisponibilidade da análise genética. Esses problemas foram o que motivaram e o que justificam a realização do presente estudo.

7.1 Variabilidade no resultado do teste enzimático confirmatório

Após teste de triagem neonatal alterado ou suspeita clínica de DB, é solicitado um teste enzimático confirmatório. Tanto o teste de triagem, que normalmente é realizado em sangue impregnado em papel-filtro, como o teste confirmatório, que é a medida quantitativa da atividade da biotinidase no soro ou plasma, podem sofrer interferências que levam a resultados falso-positivos ou falso-negativos. Os fatores interferentes dependem da metodologia utilizada, mas, de modo geral, a labilidade da enzima, prematuridade e icterícia têm um efeito importante no resultado do teste enzimático.

A biotinidase é uma enzima lábil cuja atividade diminui com o passar do tempo e com a temperatura elevada (Schulte, 2003). As principais causas para os falso-positivos e divergência nas repetições do teste enzimático são o inadequado manuseio, transporte e estocagem das amostras, que levam à diminuição da atividade enzimática. Para tornar o teste confirmatório mais confiável, é recomendado que juntamente com a amostra do probando sejam coletadas e enviadas amostras dos pais (potencial referência de heterozigotos) e de um controle não relacionado (indicador das condições de manuseio e transporte), todas congeladas e transportadas com gelo seco (Wolf, 2010). No Brasil, são poucos os laboratórios que realizam o teste de diagnóstico da DB - o serviço é restrito a alguns laboratórios especializados privados e públicos - e, devido à grande dimensão do país, algumas amostras acabam sendo transportadas e armazenadas por um período longo de tempo. De modo que a biotinidase é muito lábil, e nem sempre amostras dos pais e controle são enviadas junto com a do paciente, o teste perde muito em confiabilidade.

Foi verificado que a atividade de biotinidase possui correlação direta com a idade gestacional. Recém-nascidos prematuros, e mesmo aqueles nascidos a termo, só atingem os valores de referência definidos para adultos semanas após o nascimento (Suormala et al., 1988). Outro estudo mostrou que aproximadamente 50% dos testes de triagem falso-positivos são de recém-nascidos prematuros (Thibodeau et al., 1993). Portanto, se o teste confirmatório for solicitado logo após o resultado alterado do teste de triagem, ou seja, nas primeiras semanas de vida, é possível que o teste detecte uma deficiência transitória. O período ideal para solicitação do teste confirmatório após triagem alterada não está definido na literatura.

Em recém-nascidos com icterícia (prematuros, pequenos para a idade gestacional e nascidos à termo) foi encontrada atividade da biotinidase reduzida. É provável que a causa seja o comprometimento da função hepática, mas também é possível que altas concentrações de bilirrubina total provoquem inibição da atividade da biotinidase sérica. É recomendado que a idade gestacional bem como os níveis de bilirrubina total sejam escritos no cartão da amostra para triagem neonatal para a correta interpretação do resultado (Schulpis et al., 2003).

Já foi relatado que existe um aumento da ansiedade e estresse em pais de recém-nascidos que necessitam de testes de seguimento após a triagem neonatal (Hewlett and Waisbren, 2006). Testes confirmatórios consecutivos com resultados discordantes dificultam a classificação dos pacientes em DB total, DB parcial, heterozigotos ou indivíduos com atividade normal. Nesses casos, é possível que a incerteza do diagnóstico, prognóstico e risco de recorrência mantenha a situação de estresse em relação ao probando e também em relação ao planejamento familiar.

7.2 Iminente aumento de testes confirmatórios inconclusivos

No Brasil, a triagem neonatal para DB é oferecida por serviços privados e está sendo progressivamente disponibilizada por serviços públicos em todos os estados. Na Portaria nº 2829/GM/MS de 14 de dezembro de 2012, foi instituída a fase IV no PNTN (conhecido com teste do pezinho e oferecido de forma universal), a qual acrescenta a triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita e DB. A fase IV compreende a triagem neonatal para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doença falciforme e outras hemoglobinopatias,

fibrose cística, hiperplasia adrenal congênita e DB, bem como a confirmação diagnóstica, acompanhamento e tratamento dos casos identificados. Doze estados já estão habilitados na fase IV – Amazonas, Rondônia, Bahia, Piauí, Tocantins, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Portarias SAS/MS nº 1.394 de 11.12.13, nº 1.329 de 27.11.13, nº 62 de 28.01.14, nº 1.395 de 11.12.13, nº 1.361 de 04.12.13, nº 659 de 19.06.13, nº 476 de 29.04.13, nº 500 de 06.05.13, nº 506 de 06.05.13, nº 499 de 06.05.13, nº 655 de 18.06.13 e nº 1.396 de 11.12.13, respectivamente) - e a implementação em todos os estados brasileiros está prevista até o final de 2014.

Toda criança com resultado alterado na triagem neonatal (ou seja, que supostamente tem DB) deve realizar a determinação quantitativa de atividade da biotinidase no soro/plasma para confirmar o diagnóstico (Wolf, 2012). Infelizmente a biotinidase na amostra de plasma/soro é sensível às condições ambientais e por isso o teste confirmatório também pode indicar uma atividade menor do que a verdadeira. Em muitos casos, repetições do teste confirmatório apresentam resultados discordantes.

Um estudo de triagem bioquímica e genética, realizado em um serviço privado de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil), revelou que a taxa de reconvocação para o teste confirmatório (0,12%), a taxa de falso-positivos (0,09%) e a discrepância entre medidas enzimáticas repetidas são consideravelmente altas. A análise genética excluiu o diagnóstico de DB de algumas crianças cujos testes quantitativos variavam entre a normalidade e a DB, pois eram heterozigotas para a doença ou não apresentavam alteração genética (Neto et al., 2004).

Com a ampliação do PNTN, mais recém-nascidos terão a oportunidade de serem triados para DB. Desse modo, é esperado um aumento do número de testes de triagem com alteração, e uma maior demanda por testes confirmatórios. Por enquanto, são poucos os laboratórios que executam o teste confirmatório. Visto que as amostras devem ser transportadas até os laboratórios especializados, que o Brasil tem uma grande dimensão territorial e que a enzima é instável, estamos frente a um aumento iminente do número de testes enzimáticos confirmatórios com resultados inconclusivos.

7.3 Indisponibilidade da análise genética

Devido às falsas alterações que podem ocorrer no teste enzimático, indivíduos cuja atividade da biotinidase está abaixo do valor de referência representam um desafio (principalmente os assintomáticos identificados por triagem neonatal), tanto no diagnóstico quanto na decisão terapêutica. A análise genética é importante na diferenciação de indivíduos com DB total daqueles com DB parcial e, de indivíduos com DB parcial dos que são heterozigotos, quando testes enzimáticos repetidos são discordantes (Cowan et al., 2010); na avaliação de bebês prematuros com atividade da biotinidase baixa; e na avaliação de bebês que passaram por transfusão de sangue (Wolf, 2010).

As amostras utilizadas na análise do DNA necessitam de condições de transporte menos criteriosas e se mantêm estáveis por mais tempo após a coleta do que as amostras de soro/plasma utilizadas no teste enzimático (Cowan et al., 2010). Mas, infelizmente, a análise genética ainda não está disponível no país.

Os problemas com o teste enzimático confirmatório citados anteriormente justificam a necessidade de haver um serviço que ofereça a análise do gene *BTD*. Para a implantação da análise genética no Brasil, é importante conhecermos o perfil genético da população alvo. É de nosso conhecimento apenas um estudo publicado que incluiu a análise genética em pacientes brasileiros, o qual avaliou 21 pacientes (Neto et al., 2004). Consideramos importante a avaliação de uma amostra maior de pacientes e, além disso, a avaliação de uma amostra da população em geral. Para a correta interpretação do resultado da análise genética, é necessário saber se a alteração encontrada não é apenas uma variante comum na população (polimorfismo), por isso é muito importante conhecermos as variantes não patogênicas e suas frequências na população.

Enfim, a análise genética é útil na classificação de indivíduos com atividade da biotinidase reduzida em DB total, DB parcial ou heterozigoto, e pode contribuir para o melhor entendimento das correlações entre genótipos e fenótipos.

8 HIPÓTESES

Pacientes com DB apresentam alterações na sequência nucleotídica ao longo da região codificante e junções éxon-íntron do gene *BTD*, com exceção do éxon 1 - até o presente, nenhuma alteração no éxon 1 foi encontrada em vários estudos publicados que realizaram sequenciamento completo do gene. Nos demais éxons, foram descritas variantes de diferentes classes, sendo que as variantes do tipo sentido trocado são predominantes (Pindolia et al., 2010). A análise genética de pacientes brasileiros provavelmente revelará diferentes tipos de variantes com predominância do tipo sentido trocado.

Dentre os indivíduos com DB total, as variantes c.98_104del7ins3, p.R538C, p.Q456H e p.[A171T;D444H] podem estar presentes na maioria dos alelos (Norrgard et al., 1999). Por outro lado, quase todos os indivíduos com DB parcial devem possuir um alelo com a variante p.D444H e outro alelo com uma variante de DB total (Swango et al., 1998).

É possível que alguns pacientes inicialmente diagnosticados com DB por teste enzimático tenham genótipo incompatível com DB, como aconteceu no grupo de 21 pacientes brasileiros analisados por Neto et al. (2004), em que 4 eram heterozigotos para a doença e 3 não apresentavam alteração no gene que codifica a biotinidase.

A incidência de DB no Brasil pode ser uma das mais altas já conhecidas conforme indicam estudos publicados (Pinto et al., 1998, Neto et al., 2004, Luz et al., 2008, Lara, 2010). É possível que essa incidência aumentada ocorra devido a uma frequência relevante da variante p.D444H na população em geral. Acredita-se que essa alteração seja uma variante comum (frequência alélica maior do que 1%), pois ela causa uma diminuição na atividade da biotinidase que não chega a comprometer a saúde inclusive de indivíduos homozigotos. Além disso, dois estudos norte americanos e um húngaro caracterizaram a variante p.D444H como um polimorfismo carregado por indivíduos assintomáticos com frequência alélica estimada na população em geral de 3,9% (Norrgard et al., 1998), 5,8% (Bell et al., 2011), e 5,5% (Milankovics et al., 2010), respectivamente. Enfim, existe dúvida quando a frequência da variante p.D444H na população brasileira em geral.

9 OBJETIVOS

9.1 Objetivo primário

Caracterizar o perfil clínico e genético (por análise do gene *BTD*) de uma amostra de pacientes brasileiros com atividade enzimática da biotinidase reduzida.

9.2 Objetivos secundários

- I. Identificar as variantes mais frequentes do gene *BTD*;
- II. Comparar a frequência das variantes entre os dois grupos: pacientes identificados por triagem neonatal e pacientes identificados por suspeita clínica;
- III. Verificar a relação entre genótipo e fenótipo bioquímico;
- IV. Demonstrar o efeito patogênico ou não patogênico de variantes que forem descritas pela primeira vez, através de análises *in silico* e da frequência alélica em indivíduos controles.
- V. Estimar na população, a partir de uma amostra de indivíduos controles, a frequência da variante p.D444H e prever o efeito dela na funcionalidade da proteína por análise *in silico*.

10 ARTIGO

O manuscrito que segue foi submetido para a revista *Molecular Genetics and Metabolism*, cujo fator de impacto é 2,8 e o Qualis CAPES da área de genética (Ciências biológicas I) é A2. Seu formato obedece as normas da revista.

Title

Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 Brazilian patients

Authors

Taciane Borsatto^{a,b}, Fernanda Sperb-Ludwig^{c,d}, Gisele R. De Luca^e, Francisca L. Carvalho^e, Carolina F. M. De Souza^f, Paula F. V. De Medeiros^g, Charles M. Lourenço^h, Reinaldo L. O. Filhoⁱ, Eurico C. Neto^j, Pricila Bernardi^k, Sandra Leistner-Segal^{c,f}, Ida V. D. Schwartz^{a,b,f,l}

Affiliations

^a Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil;

^b BRAIN Laboratory, Center for Experimental Research (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil;

^c Post Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS, Brazil;

^d Gene Therapy Center, CPE, HCPA, Brazil;

^e Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, SC, Brazil;

^f Medical Genetics Service, HCPA, Brazil;

^g Universidade Federal de Campina Grande, PB, Brazil;

^h Medical Genetics Service, Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil;

ⁱ Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, AL, Brazil;

^j CTN Diagnósticos, Porto Alegre, RS, Brazil;

^k Hospital Universitário-Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil;

^l Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Ida Vanessa Doederlein Schwartz

idadschwartz@gmail.com

Medical Genetics Service – HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903 - Porto Alegre-RS, BRAZIL

Phone + 55 51 33598309

Fax + 55 51 33598010

Abstract

Biotinidase deficiency (BD) is an inborn error of metabolism in which some genetic variants correlate with the level of enzyme activity. Biotinidase activity, however, may be artifactually low due to enzyme lability, premature birth, and jaundice; this hinders both phenotypic classification and the decision to implement therapy. This study sought to characterize the clinical and genetic profile of a sample of Brazilian patients exhibiting reduced biotinidase activity. This observational, multicenter study used a convenience sampling strategy, with sequencing of exons 2, 3, and 4 of the *BTD* gene. The sample comprised 38 individuals with biochemical phenotypes defined a priori on the basis of biotinidase activity in serum/plasma (2 with profound deficiency, 9 with partial deficiency, 15 heterozygous, 1 borderline between partial deficiency and heterozygosity, 2 borderline between heterozygous and normal) or dried blood spot sample (n=9, all with unspecified deficiency). Most patients were from Southern Brazil (n=29/38) and were identified by neonatal screening (n=33/38). Parental consanguinity was reported in two cases. The most commonly found genetic variants were c.1330G>C (p.D444H), c.755A>G (p.D252G), and c.[1330G>C;511G>A] (p.[D444H;A171T]), with allele frequencies of 50%, 9.4%, and 5.4% respectively. Three novel pathogenic variants were identified (c.119T>C or p.L40P, c.479G>A or p.C160Y, and c.664G>A or p.D222N). Twenty-nine patients had two pathogenic variants detected (with *cis/trans* status ascertained in 26/29), six had only one variant, and three had no pathogenic variants detected. Genotyping confirmed the original phenotypic classification based on enzyme activity in 16/26 cases. Three polymorphic variants were identified in control individuals, of which two were nonpathogenic (c.1171C>T or p.P391S and c.1413T>C or p.C471C, with a frequency of 1.5% and 5.5% respectively) and one pathogenic (c.1330G>C, frequency 4%). Our findings suggest that partial BD is the most common form of BD in Brazil, and expand current knowledge on the allelic heterogeneity of this condition.

Keywords: biotinidase deficiency; genetic variants; neonatal screening; Brazil.

Highlights

- Molecular analysis of 38 Brazilian patients with reduced biotinidase activity revealed three novel pathogenic variants in the *BTD* gene.
- The variant c.1330G>C (p.D444H), which was most common among patients, is polymorphic in Southern Brazil.
- Partial biotinidase deficiency appears to be the most common form of biotinidase deficiency in Brazil.

Abbreviations

BD: biotinidase deficiency

NB: newborns

gDNA: genomic DNA

PCR: polymerase chain reaction

PEG: polyethylene glycol

RFLP: restriction fragment length polymorphism

F: female

M: male

NS: neonatal screening

S: symptoms

Hz: heterozygosity

N/A: not available

N: normal

d: days

m: months

y: years

NR: not reported

FIPE: *Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos*

HCPA: *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*

CNPq: National Council for Scientific and Technological Development

FAPERGS: Rio Grande do Sul Research Foundation

1 Introduction

Biotinidase deficiency (BD, EC 3.5.1.12) is an autosomal recessive disease in which both the absorption of biotin from dietary sources and its reuse/recycling are impaired. This leads to a deficiency in biotin-dependent enzymes, such as propionyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.3), β -methylcrotonyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.4), pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1), and acetyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2) (Wolf et al., 1983a, Hymes and Wolf, 1996). The age at onset of clinical manifestations varies, and these manifestations include neurological and cutaneous abnormalities (Wolf et al., 1983b). Treatment, which consists of oral administration of free biotin, is simple and effective when started early (e.g., before the onset of symptoms). If treatment is delayed, there is a risk of irreversible damage (including hearing and vision loss and mental retardation) and even death (Wastell et al., 1988, Bay et al., 2010). The diagnosis of BD is confirmed by measurement of biotinidase activity in plasma or serum. This test enables classification of patients as having profound (or total) BD (residual activity <10%) or partial BD (activity within 10-30% of average normal activity in serum). Heterozygous individuals have enzyme activity levels between those of affected patients and those of homozygous normal individuals (Wolf et al., 1983a). This classification plays an important role in instituting therapy, as patients with profound BD should be treated and heterozygous individuals should not; there is no consensus on the need for treatment of patients with partial BD (Wolf, 2010).

However, enzyme testing is subject to interfering factors that can produce artifactually low results, such as the lability of biotinidase (Wolf, 2003) and the direct correlation between enzyme activity and gestational age and even with postnatal age (Suormala et al., 1988). Furthermore, jaundiced neonates may have reduced biotinidase activity (Schulpis et al., 2003). Analysis of the *BTD* gene is important, particularly to elucidate the diagnosis when repeated enzyme testing yields discordant results (Cowan et al., 2010), in the assessment of premature infants with reduced biotinidase activity, and in the assessment of infants who have received blood transfusions (Wolf, 2010).

Before 2012, neonatal screening for BD was unavailable through the public Unified Health System in the majority of Brazilian states, and was only

provided by private laboratories located mainly in the South and Southeast regions of the country, which may have contributed to its underdiagnosis. Paradoxically, studies based on neonatal screening suggest that the overall frequency of BD (profound + partial BD) in Brazil may be among the highest ever reported, ranging from 1:6,843 to 1:62,500 newborns (NB) (Pinto et al., 1998, Neto et al., 2004, Luz et al., 2008); the estimated worldwide incidence is 1:60,089 NB overall, 1:112,271 NB for profound deficiency, and 1:129,282 NB for partial deficiency (Wolf, 1991). To the best of our knowledge, only one prior study conducted DNA analysis of Brazilian patients with this condition (n=21) (Neto et al., 2004).

This study seeks to describe the clinical and genetic profile of a sample of Brazilian patients presenting reduced biotinidase activity.

2 Materials and methods

This is a multicenter, observational, cross-sectional study with a convenience sampling strategy. The study protocol was approved by the ethics committees of all centers involved, and all patients and/or their legal guardians provided written informed consent.

The study sample comprised 38 unrelated subjects (21 male), aged 1 month to 18 years, who were recruited from several regions of Brazil (29 from the South, 3 from the Southeast, and 6 from the Northeast) during 2012–2013 by contacting medical geneticists throughout the country. The criterion for inclusion was reduced biotinidase activity (below the lower reference limit of the testing laboratory). Clinical variables such as age, biotinidase activity, and symptoms were obtained by a review of medical records and by a data collection form filled out by the referring physicians. For genetic analysis, blood was collected from patients and their parents into EDTA-containing tubes. Overall, samples from both parents were available for 27 patients, samples from only one parent were available for 6 patients, and 5 patients had no parental samples available. Anonymous samples from 100 healthy, adult controls from Southern Brazil were tested for the c.1330G>C (p.D444H) variant and for all novel variants first described in the present study.

2.1 Biotinidase activity

Data on biotinidase activity were collected retrospectively, as explained elsewhere. Patients had undergone enzyme activity testing at four different laboratories (A, B, C, and D), one of which (laboratory A, n=9/38 patients) only carries out filter-paper testing, a technique that cannot quantitate the degree of BD and expresses activity in units (U) (Neonatal Biotinidase kit, PerkinElmer®, Wallac Oy, Turku, Finland). In these cases, patients were diagnosed by the attending staff as having BD after three consecutive abnormal tests (below the 70U cutoff), and were thus not classified into partial or profound BD. The activity presented in this study is the average of the three tests (Table 1). The remaining patients (n=29/38) underwent quantitative enzymatic testing (after abnormal neonatal screening or clinical suspicion) at laboratories B, C, and D, in plasma or serum, as described by Wolf et al. (1983) (Wolf et al., 1983a). The normal reference range is 5.0–10 nmol/min/mL. The following enzyme activity ranges were used for classification of biochemical phenotype: <0.75, profound deficiency; 0.75–2.25, partial deficiency; 2.26–4.9, heterozygosity. When more than one measurement was available, the highest level was used for classification (Table 1).

2.2 *BTD* gene analysis

Genomic DNA (gDNA) was extracted from blood collected into EDTA-containing tubes using an Easy-DNA™ Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) in accordance with manufacturer instructions. Exons 2, 3, and 4 and exon/intron junctions of the *BTD* gene were amplified and sequenced. Regions with detectable changes were assessed in the patients' parents (data not shown), to confirm whether variants were in *cis* or *trans*. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using previously described primers (Wolf et al., 2005) and the following annealing temperatures: 58°C for amplicons 2 and 3, 59°C for 4a, 60°C for 4b, and 62°C for 4c and 4d. PCR products were purified with polyethylene glycol 8000 solution (PEG 8000 50%, NaCl 2.5M) and sequenced using a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Finally, the resulting sequences were compared with the reference sequence of the *BTD* gene (NG_008019.1).

For calculation of allele frequencies, the total number of alleles was set at 74, as two patients were the children of consanguineous parents.

Control subjects were tested for the presence of variants c.119T>C (p.L40P) and c.664G>A (p.D222N) by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis – allele C of c.119T>C introduces a site for the restriction enzyme *Sma*I, whereas allele A of c.664G>A removes a cleavage site for *Taq*I – and variants c.479G>A (p.C160Y) and p.D444H by direct sequencing of amplicons 4a and 4d respectively, which enabled identification of additional variants in these amplicons.

2.3 *In silico* analysis

All variants described in patients for the first time in this study, as well as all missense variants found in controls, were evaluated for pathogenicity by *in silico* analysis with PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010) and SIFT (Kumar et al., 2009) softwares.

2.4 Genotype-phenotype correlation

Expected biochemical phenotype (e.g., profound BD, partial BD or heterozygous state) was established only for genotypes composed of recurrent pathogenic variants with a known *cis/trans* configuration, and that are known to correlate with the phenotype. As *BTD* variants that cause complete loss of biotinidase activity are considered profound BD alleles (Wolf, 2000 [Updated 2013 Dec 5]), a combination of two such alleles was considered to be associated with profound BD. Individuals with one profound BD allele and a normal allele were considered heterozygotes (Wolf, 2000 [Updated 2013 Dec 5]). Individuals who were compound heterozygotes for the p.D444H variant and a variant that results in profound BD were expected to have partial BD (Wolf, 2000 [Updated 2013 Dec 5]). One *BTD* allele with both the p.D444H and (c.511G>A) p.A171T or with both p.D444H and c.470G>A (p.R157H) variants in *cis* (p.[D444H;A171T] or p.[D444H; R157H), results in an allele causing profound BD (Norrgard et al., 1999). Individuals who are homozygous for the p.D444H variant were considered as having the heterozygous biochemical phenotype (Wolf, 2000 [Updated 2013 Dec 5]).

3. Results

3.1 Clinical aspects

Of the 38 subjects included in the study (Table 1), two had profound BD, nine had partial BD, 15 were heterozygous, one had borderline biotinidase activity between partial BD and heterozygosity, and two had borderline activity between heterozygous and normal-range values. Nine patients had undergone filter-paper screening alone, and thus had unspecified BD. Two patients (5.3%, patients 31 and 38) had consanguineous parents. Only one subject (patient 34) had a family history suggestive of BD recurrence – namely, a sister who died at age 3 years with clinical manifestations consistent with BD, but no confirmed diagnosis.

Thirty-three patients were identified by neonatal screening (Table 1), of whom 27 were on biotin (10 mg/day); none had clinical manifestations suggestive of BD at the time of inclusion. Six patients (patients 07, 10, 14, 15, 17, 21) were preterm and had been born between 35 and 36 weeks of pregnancy. Neonatal jaundice was reported for patients 15 and 24. Another five patients had been diagnosed on the basis of clinical suspicion. In these patients, the most common symptoms were visual disturbances, neurological manifestations, and skin lesions (Table 2). The age at onset of manifestations ranged from 1 day to 10 years, and the age at diagnosis of BD, from 40 days to 18 years. All were receiving biotin supplementation (10–20 mg/day) at the time of writing.

3.2 Genetic assessment

A total of 17 different alleles were found among the analyzed patients: 13 variants considered pathogenic, three novel variants (p.L40P, p.C160Y and p.D222N), and one synonymous variant (Table 1). No changes were found in exon 3. The most common variants were p.D444H, c.755A>G (p.D252G) and p.[D444H;A171T], with allele frequencies of 50%, 9.4%, and 5.4% respectively.

Twenty-nine patients had two pathogenic variants detected (with *cis/trans* status ascertained in 26/29), six had only one variant, and three had no pathogenic variants detected. Among patients in whom both classification of biochemical phenotype and genotyping were possible (n=26/38), genotyping confirmed the original classification in 16: profound BD in two cases (patients 34 and 38), partial BD in seven (patients 03, 06, 07, 10, 11, 13, and 14),

heterozygous-like phenotype in five (patients 16, 17, 21, 22, and 24), and a normal phenotype in two patients with borderline enzyme activity (patients 01 and 15). Discordance between genotype and biochemical phenotype was seen in seven cases (patients 04, 09, 12, 19, 35, 36, and 37), which are described in Table 3. In three subjects (patients 02, 18, and 23), genotyping revealed novel variants, thus precluding prediction of biochemical phenotype.

The frequencies of *BTD* gene variants found in controls are reported in Table 4, and *in silico* predictions of their pathogenicity are shown in Table 5.

4. Discussion

This study characterized the clinical and molecular profile of Brazilian patients with reduced biotinidase activity and, thus, at risk of BD. It is one of very few studies on this topic conducted in Latin America, and the Brazilian study with the largest sample thus far.

Two studies conducted in the U.S., in which 92 patients with profound BD and 19 with partial BD were assessed, showed that the most common *BTD* variants in the study population were c.98_104del7ins3, c.1612C>T (p.R538C), c.1368A>C (p.Q456H), p.[A171T;D444H] and p.D444H, which, overall, accounted for approximately 60% of abnormal alleles found in the sample (Swango et al., 1998, Norrgard et al., 1999). Taking into account this five-variant panel, p.[A171T;D444H] and p.D444H account for approximately 55% of alleles detected in the present study, with the occurrence of variants c.98_104del7ins3 and p.R538C in only one patient each. In our sample, we did not detect the variant p.Q456H, the profound BD allele most commonly found among children diagnosed by neonatal screening in the U.S. (allele frequency=28%) (Norrgard et al., 1999), nor did we find any changes in exon 3. Furthermore, p.D252G appeared to occur more commonly (allele frequency=9.4%) in our sample than in the U.S. population (Norrgard et al., 1999). Our findings corroborate those of Neto et al. (2004) (Neto et al., 2004), who analyzed the *BTD* gene in 21 Brazilian patients with reduced biotinidase activity detected by neonatal screening and also found that p.D444H, c.98_104del7ins3, p.[A171T;D444H], and p.D252G were the most prevalent variants; the authors also did not detect variant p.Q456H or changes in exon 3 among their sample. Therefore, we suggest that the profile of genetic variants

found among Brazilian patients with BD differs from that found in U.S. patients, although these differences may be partly attributable to the relatively small number of patients with profound BD included in our sample (c.98_104del7ins3, p.R538C and p.Q546H are classically associated with profound BD). Since the p.D444H variant, the most common variant found in our study, is usually classified as a partial DB allele – individuals who are compound heterozygotes for the p.D444H variant and a variant that results in profound BD are expected to have ~20–25% of normal biotinidase activity (Swango et al., 1998, Wolf, 2012) – our findings also suggest that partial BD is the most common form of BD in Brazil.

As previously reported, the association between *BTD* genotype and biotinidase activity is not absolute (Neto et al., 2004, Thodi et al., 2013). In the Greek study conducted by Thodi et al. (2013) (Thodi et al., 2013), for instance, homozygosity for p.D444H was suggested to be associated with partial BD, and not with a 45–50% reduction of biotinidase activity, as expected. Three subjects in our sample (patients 04, 09, and 12) exhibited enzyme activity levels slightly higher (suggestive of heterozygosity) than expected in view of their genotype (suggestive of partial BD). The genotypes p.D444H/c.595G>A (p.V199M) (patient 04) and p.V199M/p.V199M have previously been reported in patients with residual biotinidase activity levels of 32% and 11.5% respectively (Wolf et al., 2002a), and it is possible that the p.V199M variant is not as damaging as other profound BD alleles. These disagreements may also be explained by interference of other genetic and/or environmental factors that offset the effects of *BTD* variants. Four patients, one from Northeast Brazil (patient 19) and three from the Southeast region (patients 35, 36, and 37), underwent testing at a laboratory in the South region, which revealed enzyme activity lower (suggestive of heterozygosity) than expected in view of the genotype (no variants found). These biochemical test results may have been artifactually low due to time constraints or transportation of samples to the laboratory under inadequate conditions, as suggested by Neto et al. (2004) (Neto et al., 2004). However, we cannot rule out the presence of changes in a region of the *BTD* gene not covered by our analyses causing decreased enzyme activity.

In three patients, we were unable to define the *cis/trans* status of variant p.D444H in relation to the other variant found. On the basis of enzyme activity,

trans status is most probable for patient 05. For patient 08, who presented with a biotinidase level suggestive of heterozygosity (but very close to the upper limits of partial DB), only gDNA from her mother, who also presented low biotinidase activity in a dried spot blood sample (data not shown), was available for analysis; as she was found to be a carrier of both p.D444H and c.643C>T (p.L251F) variants, the patient can be heterozygous if both variants were inherited on the maternal side (if they were *in cis*), or have partial BD if p.D444H was inherited from the father and only p.L251F from the mother (in this case, the mother should also exhibit partial DB). Similarly, both parents of patient 20, who is heterozygous for variants p.D444H and c.1629C>A (p.D543E), are heterozygous for p.D444H, but the father is also a carrier of p.D543E; therefore, the patient can be heterozygous if p.D444H and p.D543E are *in cis* in the paternal allele, or can have partial DB if they are *in trans* (in which case the father should also exhibit partial DB). A new enzyme activity test in the child and testing of parents (or even analysis of grandparent DNA) could help characterize BD in this case.

Although the enzyme activity of symptomatic patients 35, 36, and 37 was not consistent with profound or partial BD, biotin treatment was started after other genetic conditions had been ruled out, as the patients' clinical manifestations are consistent with BD and biotin has a good safety profile. Unfortunately, we are not aware whether there was any improvement with treatment. These patients may represent cases of delayed-onset BD, but the absence of variants in exons 2–4 of the *BTD* gene suggest they do not have BD. Patient 15 is also very interesting, since his biotinidase activity levels were very low on neonatal screening, and gradually approached the normal range thereafter, as would be expected to his genotype. We believe the wide variation in biotinidase levels presented by this patient is mainly explained by premature birth and neonatal jaundice. However, as the first test was performed when he was only 5 days old and the last at age 1 year, some of this variation could also be due to increasing age.

On the basis of the allele frequency of novel variants p.L40P and p.C160Y in controls and of the *in silico* prediction of pathogenicity, and taking observed enzyme activity into account, these alleles were considered probably damaging, and patients 02 and 18, who are compound heterozygous for the

p.D444H variant, probably have partial BD. Variant p.L40P does not affect the peptide portion that constitutes the mature protein, but affects the signal peptide, which may impair targeting of the enzyme to secretory vesicles, thus resulting in reduced enzyme activity in plasma. Alleles associated with profound BD which affect this region have been described elsewhere (Pomponio et al., 1995, Pomponio et al., 1997). The effect of variant p.D222N on biotinidase function could not be established clearly from bioinformatics, as we used two different software programs which presented contradictory conclusions regarding this variant. However, the absence of this variant in controls suggests it is probably damaging.

In our sample, the rate of consanguinity (5.3%) was only slightly higher than that reported for the overall population of Brazil (1.6%) (Liascovich et al., 2001). We thus infer that cases of reduced biotinidase activity are not expressly linked to parental consanguinity, which suggests a high population-wide frequency of pathogenic alleles. We found that allele C of the variant c.1330G>C or p.D444H constituted 4% of alleles in healthy individuals, a frequency close to that found in the U.S. population (Norrgard et al., 1998, Bell et al., 2011), where the incidence of profound and partial BD has been estimated at 1:80,000 NB and 1:31,000–1:40,000 NB respectively (Cowan et al., 2010), and in Western Hungary (Milankovics et al., 2010), where the incidence of profound and partial BD is 1:97,000 NB and 1:23,000 NB respectively (Milankovics et al., 2010). Therefore, our data suggest that the incidence of partial BD in Brazil may also be higher than the worldwide estimate (1:129,282 NB (Wolf, 1991)). Regarding the two nonpathogenic polymorphic variants found in controls, c.1171C>T or p.P391S (rs35034250) and c.1413T>C or p.C471C (rs3817641), both were found at frequencies similar to those reported in populations of USA and African origin (available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>).

5. Conclusion

Genotyping of Brazilian patients with reduced biotinidase activity broadened current knowledge on the allelic heterogeneity of BD. Furthermore, the low rate of parental consanguinity and the high frequency of the p.D444H variant in patients and controls suggest that the incidence of partial BD in Brazil

may be higher than worldwide estimates. When enzyme activity approaches the border between partial BD and heterozygosity, sequencing of the *BTD* gene (starting with analysis of exons 2 and 4) appears to be the most appropriate technique to elucidate the diagnosis in this population. We suggest that parental DNA analysis be carried out whenever the p.D444H variant and another variant are detected in a BD patient.

6. Acknowledgments

This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the Rio Grande do Sul Research Foundation (FAPERGS). The authors would like to thank the staff at the HCPA Inborn Errors of Metabolism Laboratory/Rede EIM, and Mr. Regis Guidobono in particular, for the diagnosis and follow-up of some of the patients included in the sample.

7. References

- [1] J. Hymes, B. Wolf, Biotinidase and its roles in biotin metabolism *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 255 (1996) 1-11.
- [2] B. Wolf, R.E. Grier, R.J. Allen, S.I. Goodman, C.L. Kien, Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 131 (1983) 273-281.
- [3] B. Wolf, R.E. Grier, R.J. Allen, S.I. Goodman, C.L. Kien, W.D. Parker, D.M. Howell, D.L. Hurst, Phenotypic variation in biotinidase deficiency *The Journal of pediatrics* 103 (1983) 233-237.
- [4] L.B. Bay, S. de Pinho, H.D. Eiroa, I. Otegui, R. Rodriguez, [The importance of a law on time: presentation of a girl with biotinidase deficiency who was not picked up through the neonatal screening] *Archivos argentinos de pediatria* 108 (2010) e13-16.
- [5] H.J. Wastell, K. Bartlett, G. Dale, A. Shein, Biotinidase deficiency: a survey of 10 cases *Archives of disease in childhood* 63 (1988) 1244-1249.
- [6] B. Wolf, Clinical issues and frequent questions about biotinidase deficiency *Mol Genet Metab* 100 (2010) 6-13.
- [7] B. Wolf, Biotinidase Deficiency: New Directions and Practical Concerns *Current treatment options in neurology* 5 (2003) 321-328.
- [8] T. Suormala, H. Wick, E.R. Baumgartner, Low biotinidase activity in plasma of some preterm infants: possible source of false-positive screening results *European journal of pediatrics* 147 (1988) 478-480.
- [9] K.H. Schulpis, S. Gavrili, J. Tjamouranis, G.A. Karikas, A. Kapiki, C. Costalos, The effect of neonatal jaundice on biotinidase activity *Early Human Development* 72 (2003) 15-24.

- [10] T.M. Cowan, M.G. Blitzer, B. Wolf, C. Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance, Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 12 (2010) 464-470.
- [11] G.S. Luz, M.D. Carvalho, S.M. Pelloso, I.H. Higarashi, [Prevalence of diseases diagnosed by the Program of Neonatal Screening in Maringa, Parana, Brazil: 2001-2006] *Revista gaucha de enfermagem / EENFUFGRS* 29 (2008) 446-453.
- [12] E.C. Neto, J. Schulte, R. Rubim, E. Lewis, J. DeMari, C. Castilhos, A. Brites, R. Giugliani, K.P. Jensen, B. Wolf, Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 37 (2004) 295-299.
- [13] A.L. Pinto, K.M. Raymond, I. Bruck, S.A. Antoniuk, [Prevalence study of biotinidase deficiency in newborns] *Revista de saude publica* 32 (1998) 148-152.
- [14] B. Wolf, Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency *Journal of inherited metabolic disease* 14 (1991) 923-927.
- [15] B. Wolf, K.P. Jensen, B. Barshop, M. Blitzer, M. Carlson, D.R. Goudie, G.H. Gokcay, M. Demirkol, T. Baykal, F. Demir, S. Quary, L.Y. Shih, H.F. Pedro, T.H. Chen, A.E. Slonim, Biotinidase deficiency: novel mutations and their biochemical and clinical correlates *Human mutation* 25 (2005) 413.
- [16] I.A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A.S. Kondrashov, S.R. Sunyaev, A method and server for predicting damaging missense mutations *Nature methods* 7 (2010) 248-249.
- [17] P. Kumar, S. Henikoff, P.C. Ng, Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm *Nature protocols* 4 (2009) 1073-1081.
- [18] B. Wolf, Biotinidase Deficiency, in: R.A. Pagon, M.P. Adam, T.D. Bird, e. al. (Eds.), *GeneReviews™* [Internet], Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2000 [Updated 2013 Dec 5].
- [19] K.J. Norrgard, R.J. Pomponio, J. Hymes, B. Wolf, Mutations causing profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in the United States occur at different frequencies than in symptomatic children *Pediatric research* 46 (1999) 20-27.
- [20] K.L. Swango, M. Demirkol, G. Huner, E. Pronicka, J. Sykut-Cegielska, A. Schulze, E. Mayatepek, B. Wolf, Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene *Human genetics* 102 (1998) 571-575.
- [21] B. Wolf, Biotinidase deficiency: "if you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have" *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 14 (2012) 565-575.
- [22] G. Thodi, K.H. Schulpis, E. Molou, V. Georgiou, Y.L. Loukas, Y. Dotsikas, K. Papadopoulos, S. Biti, High incidence of partial biotinidase deficiency cases in newborns of Greek origin *Gene* 524 (2013) 361-362.
- [23] B. Wolf, K. Jensen, G. Huner, M. Demirkol, T. Baykal, P. Divry, M.O. Rolland, C. Perez-Cerda, M. Ugarte, R. Straussberg, L. Basel-Vanagaite, E.R. Baumgartner, T. Suormala, S. Scholl, A.M. Das, S. Schweitzer, E. Pronicka, J.

- Sykut-Cegielska, Seventeen novel mutations that cause profound biotinidase deficiency *Mol Genet Metab* 77 (2002) 108-111.
- [24] R.J. Pomponio, T.R. Reynolds, H. Cole, G.A. Buck, B. Wolf, Mutational hotspot in the human biotinidase gene causes profound biotinidase deficiency *Nature genetics* 11 (1995) 96-98.
- [25] R.J. Pomponio, T.R. Reynolds, H. Mandel, O. Admoni, P.D. Melone, G.A. Buck, B. Wolf, Profound biotinidase deficiency caused by a point mutation that creates a downstream cryptic 3' splice acceptor site within an exon of the human biotinidase gene *Human molecular genetics* 6 (1997) 739-745.
- [26] R. Liascovich, M. Rittler, E.E. Castilla, Consanguinity in South America: demographic aspects *Human heredity* 51 (2001) 27-34.
- [27] K.J. Norrgard, R.J. Pomponio, K.L. Swango, J. Hymes, T. Reynolds, G.A. Buck, B. Wolf, Double mutation (A171T and D444H) is a common cause of profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening the the United States. *Mutations in brief no. 128. Online Human mutation* 11 (1998) 410.
- [28] C.J. Bell, D.L. Dinwiddie, N.A. Miller, S.L. Hateley, E.E. Ganusova, J. Mudge, R.J. Langley, L. Zhang, C.C. Lee, F.D. Schilkey, V. Sheth, J.E. Woodward, H.E. Peckham, G.P. Schroth, R.W. Kim, S.F. Kingsmore, Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing *Science translational medicine* 3 (2011) 65ra64.
- [29] I. Milankovics, K. Nemeth, C. Somogyi, A. Schuler, G. Fekete, High frequencies of biotinidase (BTD) gene mutations in the Hungarian population *Journal of inherited metabolic disease* 33 Suppl 3 (2010) S289-292.

Table 1. Biochemical and molecular profile of patients with reduced biotinidase activity (n=38)

Patient	Sex	Manner of diagnosis	Biotinidase activity ^a	Type of BD according to enzyme activity ^b	Allele 1	Allele 2	Expected type of BD according to genotype
01	M	NS	4.9	Borderline (Hz/N)	c.1330G>C (p.D444H)	N	≈ N
02	F	NS	1.7	Partial	c.1330G>C (p.D444H)	c.119T>C (p.L40P)	Unknown
03	F	NS	1.2; 1.9	Partial	c.1330G>C (p.D444H)	c.594_596delCGT (p.V199del)	Partial
04	F	NS	2.8	Hz	c.1330G>C (p.D444H)	c.[595G>A; 1413T>C] (p.[V199M;C471C])	Partial
05	F	NS	1.2; 2.04	Partial	c.1330G>C (p.D444H) ^c	c.100G>A ^c	Partial or Hz
06	M	NS	1.7	Partial	c.1330G>C (p.D444H)	c.755A>G (p.D252G)	Partial
07	M	NS	1.4	Partial	c.1330G>C (p.D444H)	c.[1330G>C;511G>A] (p.[D444H;A171T])	Partial
08	M	NS	2.4	Hz	c.1330G>C (p.D444H) ^c	c.643C>T (p.L215F) ^c	Partial or Hz
09	F	NS	2.5	Hz	c.1330G>C (p.D444H)	c.[1330G>C;511G>A] (p.[D444H;A171T])	Partial
10	F	NS	1.2	Partial	c.1330G>C (p.D444H)	c.755A>G (p.D252G)	Partial
11	F	NS	1.8	Partial	c.1330G>C (p.D444H)	c.[1330G>C;470G>A] (p.[D444H;R157H])	Partial
12	F	NS	2.4	Hz	c.1330G>C (p.D444H)	c.755A>G (p.D252G)	Partial
13	M	NS	1.5	Partial	c.1330G>C (p.D444H)	98_104del7ins3	Partial
14	M	NS	1.6	Partial	c.1330G>C (p.D444H)	c.933delT	Partial
15	M	NS	0.1; 2.6; 4.9	Borderline (Hz/N)	c.1413T>C (p.C471C)	N	N
16	M	NS	0.7; 3.3	Hz	c.1330G>C (p.D444H)	c.1330G>C (p.D444H)	≈ Hz
17	M	NS	3.3	Hz	c.1413T>C (p.C471C)	c.[1330G>C;511G>A] (p.[D444H;A171T])	Hz
18	M	NS	0.2; 1.7; 2.2	Borderline (Partial/Hz)	c.1330G>C (p.D444H)	c.479G>A (p.C160Y)	Unknown
19	F	NS	3.1	Hz	c.1330G>C (p.D444H)	N	≈ N
20	F	NS	2.6	Hz	c.1330G>C (p.D444H) ^c	c.1629C>A (p.D543E) ^c	Partial or Hz

21	M	NS	3.7	Hz	c.1330G>C (p.D444H)	c.1330G>C (p.D444H)	≈ Hz
22	M	NS	2.8; 2.7	Hz	c.1330G>C (p.D444H)	c.1330G>C (p.D444H)	≈ Hz
23	M	NS	3.5	Hz	c.664G>A (p.D222N)	N	Unknown
24	M	NS	1.5; 2.9; 4.4	Hz	c.1595C>T (p.T532M)	N	Hz
25	F	NS	21.88 U	N/A	c.643C>T (p.L215F)	c.755A>G (p.D252G)	Profound
26	M	NS	48.75 U	N/A	c.1330G>C (p.D444H)	c.1330G>C (p.D444H)	≈ Hz
27	M	NS	51.37 U	N/A	c.1330G>C (p.D444H)	c.755A>G (p.D252G)	Partial
28	M	NS	51.83 U	N/A	c.1330G>C (p.D444H)	c.1330G>C (p.D444H)	≈ Hz
29	F	NS	45.81 U	N/A	c.1330G>C (p.D444H)	c.[1330G>C;511G>A] (p.[D444H;A171T])	Partial
30	M	NS	46.88 U	N/A	c.1330G>C (p.D444H)	c.1330G>C (p.D444H)	≈ Hz
31 ^d	M	NS	52.73 U	N/A	c.1330G>C (p.D444H)	c.1330G>C (p.D444H)	≈ Hz
32	F	NS	40.94 U	N/A	c.1330G>C (p.D444H)	c.1330G>C (p.D444H)	≈ Hz
33	F	NS	45.37 U	N/A	c.1330G>C (p.D444H)	c.1330G>C (p.D444H)	≈ Hz
34	F	S	0.12	Profound	c.1612C>T (p.R538C)	c.1612C>T (p.R538C)	Profound
35	F	S	4.1	Hz	N	N	N
36	M	S	3.7	Hz	N	N	N
37	F	S	3.8; 2.7	Hz	c.1330G>C (p.D444H)	N	≈ N
38 ^d	M	S	0.1; 0.4; 0.33; 0.44; 0.16; 0.32	Profound	c.755A>G (p.D252G)	c.755A>G (p.D252G)	Profound

^a The cutoff for filter-paper tests performed at laboratory A is 70U. For quantitative testing in serum or plasma performed at laboratories B, C, D, the measurement unit is nmol/min/mL and the reference range is 5.0-10. Unless otherwise specified, the unit of enzyme activity is nmol/min/mL.

^b The following enzyme activity ranges were used for phenotypic classification: <0.75, profound deficiency; 0.75-2.25, partial deficiency; 2.26-5.0, heterozygosity. If more than one measurement was obtained, the highest value was considered. Values within ± 0.1 of a cutoff point were classified as borderline.

^c Variant detected in isolation in one of the alleles, but whether it is in *cis* or *trans* configuration with the variant found in the other allele remains undetermined.

^d Patients with consanguineous parents.

Novel variants shown in bold type, and synonymous variants, in italics.

BD, biotinidase deficiency; F, female; M, male; NS, neonatal screening; S, symptoms; Hz, heterozygosity; N/A, not available; N, normal.

Table 2. Reduced biotinidase activity: patients identified by clinical suspicion

Patient	Age at onset of clinical manifestations	Age at first enzyme activity test	Manifestations at diagnosis
34	2m	1y2m	Generalized dermatitis, hypotonia, neurological/psychomotor delay, motor regression, seizures, abnormal electroencephalogram, hearing loss, vision loss, tachypnea, gastroenteritis, metabolic acidosis, organic aciduria, elevated lactate levels in cerebrospinal fluid, elevated amino acid levels in plasma and urine.
35	6m	7m	Localized dermatitis, sparse hair, hypotonia, motor delay, speech delay, gastroenteritis, organic aciduria, hyperammonemia.
36	6y	18y8m	Ptosis, spastic paresis, hearing loss, optic atrophy, speech delay ^a .
37	10y	18y	Motor regression, spastic paresis, ataxia, seizures, abnormal electroencephalogram, optic atrophy, speech delay ^a , dysarthria, elevated lactate levels in cerebrospinal fluid.
38	1d	40d	Dermatitis, seizures, visual field defects, hypersensitivity (asthma, atopic dermatitis).

d, days; m, months; y, years.

^a Despite a report of speech delay, this manifestation was not taken into account by the family or physician when determining the age at onset of clinical manifestations.

Table 3. Reduced biotinidase activity: patients with discordance between biochemical phenotype and genotype

Patient	Sex	Age at enzyme activity testing	Biotinidase activity (nmol/min/mL)	Relationship between observed enzymatic activity (O) and expected activity according to genotype (E)	Site of testing laboratory (region of Brazil)	Origin of patient (region of Brazil)	Premature	Neonatal jaundice	Allele 1	Allele 2
4	F	2m	2.8	O>E	Southeast	Northeast	No	NR	c.1330G>C (p.D444H)	c.[595G>A;1413T>C] (p.[V199M;C471C])
9	F	1y	2.5	O>E	Southeast	South	No	NR	c.1330G>C (p.D444H)	c.[1330G>C;511G>A] (p.[D444H;A171T])
12	F	1y3m	2.4	O>E	Southeast	South	No	NR	c.1330G>C (p.D444H)	c.755A>G (p.D252G)
19	F	2m	3.1	O<E	South	Northeast	No	NR	c.1330G>C (p.D444H)	N
35	F	7m	4.1	O<E	South	Southeast	No	NR	N	N
36	M	18y8m	3.7	O<E	South	Southeast	No	NR	N	N
37	F	18y2m; 18y7m	3.8; 2.7	O<E	South	Southeast	No	NR	c.1330G>C (p.D444H)	N

y, years; m, months; NR, not reported.

Table 4. Biotinidase deficiency: frequency of novel variants, c.1330G>C (p.D444H) and other variants found in a sample of healthy Brazilians

Variant	Exon	No. of alleles screened	No. of mutated alleles	No. of heterozygotes	No. of homozygotes for the variant	Variant frequency
c.119T>C (p.L40P)	2	200	0	0	0	0%
c.479G>A (p.C160Y)	4a	200	0	0	0	0%
c.460-7_8insT	4a	200	1	1	0	0.5%
c.664G>A (p.D222N)	4b	200	0	0	0	0%
c.1171C>T (p.P391S)	4d	200	3	3	0	1.5%
c.1284C>T (p.Y428Y)	4d	200	1	1	0	0.5%
c.1330G>C (p.D444H)	4d	200	8	6	1	4%
c.1413T>C (p.C471C)	4d	200	11	9	1	5.5%

Novel variants are shown in bold type.

Table 5. Biotinidase deficiency: *in silico* prediction of the pathogenicity of novel variants and variants found in 100 controls.

Variant	PolyPhen-2 ^a		SIFT ^b	
	Prediction	Score	Prediction	Score
c.119T>C (p.L40P)	Probably damaging	0.930	Damaging	0.01
c.479G>A (p.C160Y)	Probably damaging	1	Damaging	0
c.664G>A (p.D222N)	Probably damaging	0.999	Tolerated	1
c.1171C>T (p.P391S)	Benign	0.002	Tolerated	0.75
c.1330G>C (p.D444H)	Probably damaging	1	Damaging	0

Novel variants are shown in bold type.

^aPolyPhen-2 prediction score ranges from 0 to 1, PolyPhen-2 calculates probability that the variant is damaging.

^bThe SIFT prediction score ranges from 0 to 1, and is the scaled probability of an amino acid being tolerated.

11 DISCUSSÃO

Classificar os pacientes com atividade da biotinidase reduzida em DB total, parcial ou heterozigose pode ser desafiador quando testes enzimáticos consecutivos são discordantes. Embora a análise genética seja esclarecedora nesses casos, é de nosso conhecimento a existência de somente um estudo publicado na literatura sobre a caracterização genética de pacientes brasileiros, o qual incluiu 21 pacientes (Neto et al., 2004). O presente estudo caracterizou o perfil clínico e genético de uma amostra maior de pacientes brasileiros com atividade reduzida de biotinidase e, portanto, em risco de apresentarem DB. Constitui-se em um dos poucos estudos realizados na América Latina sobre este tema. Além de indivíduos com atividade enzimática nas faixas da DB total e parcial, nós incluímos nas análises indivíduos com atividade na faixa da heterozigose, porque a classificação entre a DB parcial e heterozigose é crucial na decisão sobre a instituição da terapia e aconselhamento da família.

Dois estudos conduzidos nos EUA, nos quais 92 pacientes com DB total e 19 com DB parcial foram avaliados, mostraram que as variantes mais frequentes no gene *BTD* naquela população seriam c.98_104del7ins3, p.R538C, p.Q456H, p.[A171T;D444H] e p.D444H, responsáveis, no seu conjunto, por aproximadamente 60% dos alelos anormais encontrados (Swango et al., 1998, Norrgard et al., 1999). Considerando esse painel de cinco variantes, a p.[A171T;D444H] e a p.D444H correspondem a aproximadamente 55% dos alelos detectados no presente estudo, sendo que a c.98_104del7ins3 e p.R538C foram encontradas, cada uma delas, em somente um paciente. Em nossa amostra, não foi detectada a variante p.Q456H, o alelo de DB total mais frequente entre crianças diagnosticadas por triagem neonatal nos EUA (frequência alélica= 28%) (Norrgard et al., 1999), assim como não foram encontradas alterações no éxon 3. Além disso, a c.755A>G (p.D252G) pareceu ser mais frequente na nossa amostra (frequência alélica= 9,4%) do que na dos EUA. Os nossos dados estão de acordo com os de Neto et al. (2004), que também encontraram, ao analisar o gene *BTD* em 21 pacientes brasileiros com atividade reduzida da biotinidase, a p.D444H, a c.98_104del7ins3, a p.[A171T;D444H] e a p.D252G como sendo as variantes de maior prevalência;

esses autores também não detectaram a variante p.Q456H na amostra estudada, nem alterações no éxon 3. Dessa forma, sugere-se que o perfil de variantes encontradas entre os pacientes brasileiros com DB é diferente daquele encontrado nos EUA, embora as diferenças possam em parte ser atribuídas ao relativo baixo número de pacientes com DB total incluídos na presente amostra (c.98_104del7ins3, p.R538C e p.Q546H são classicamente associadas à DB total). Uma vez que a variante p.D444H, a mais comum em nosso estudo, está associada à DB parcial – indivíduos que são heterozigotos compostos para p.D444H e um alelo de DB total apresentam ~20–25% da atividade normal de biotinidase – nossos achados também sugerem que a DB parcial é a forma mais comum da DB no Brasil (Swango et al., 1998, Wolf, 2012).

Como relatado anteriormente, a relação entre o genótipo do *BTD* e a atividade da biotinidase não é exata (Neto et al., 2004, Thodi et al., 2013). O estudo grego de Thodi et al. (2013), por exemplo, sugeriu que a homozigose para c.1330G>C (p.D444H) está associada à DB parcial (e não com uma redução de 45-50% na atividade da biotinidase, como esperado). Três pacientes (pacientes 04, 09 e 12) apresentaram atividade enzimática sutilmente maior (heterozigose) do que a esperada pelo genótipo (DB parcial). Os genótipos p.D444H / c.595G>A (p.V199M) (paciente 04) e p.V199M/p.V199M já foram encontrados em pacientes com atividades residuais de biotinidase de 32% e 11,5%, respectivamente (Wolf et al., 2002a), havendo a possibilidade de p.V199M não ser tão deletéria quanto os outros alelos de DB total. Quatro pacientes provenientes do nordeste (paciente 19) e sudeste do Brasil (pacientes 35, 36 e 37), realizaram teste em laboratório localizado na região sul e apresentaram atividade enzimática menor (compatível com heterozigose) do que a esperada pelo genótipo (nenhuma alteração foi encontrada). Os resultados bioquímicos podem estar falsamente reduzidos devido ao tempo ou às condições inadequadas de transporte das amostras até o laboratório, conforme já sugerido no trabalho de Neto et al. (2004). Porém, não se descarta a presença de alteração em região do *BTD* não analisada que seja responsável pela atividade diminuída. Vale lembrar que neste estudo não foi analisado o éxon 1 porque nenhuma mutação foi encontrada em vários estudos publicados

que realizaram sequenciamento completo do gene (Muhl et al., 2001, Wolf et al., 2002a, Ye et al., 2009, Iqbal et al., 2010). As discordâncias também podem ser explicadas pela interferência de fatores genéticos e/ou ambientais que compensam o efeito das variantes do *BTD*.

Em três pacientes não foi possível definir se a variante p.D444H está em *cis* ou *trans* com a outra alteração encontrada. Com base na atividade enzimática, é provável que esteja em *trans* no paciente 05. Para o paciente 08, o qual apresenta nível de atividade sugestivo de heterozigose (mas próximo do limite superior da DB parcial), apenas o gDNA da mãe, a qual apresentou atividade da biotinidase reduzida em papel-filtro (dados não apresentados), estava disponível para análise; uma vez que ela é carreadora das variantes p.D444H e c.643C>T (p.L251F), o paciente pode ser heterozigoto se ambas variantes foram herdadas no alelo materno (se elas estão em *cis*), ou pode ter DB parcial se p.D444H foi herdada do pai e apenas a p. L215F da mãe (neste caso, a mãe também deve apresentar DB parcial). De forma semelhante, o pai e a mãe do paciente 20, o qual é heterozigoto para p.D444H e c.1629C>A (p.D543E), possuem a p.D444H em heterozigose, mas o pai também é carreador da p.D543E; desse modo, o paciente pode ser heterozigoto se p.D444H e p.D543 estão em *cis* no alelo paterno, ou pode ter DB parcial se elas estão em *trans* (neste caso, o pai também deve apresentar DB parcial). A repetição do teste enzimático da criança e a testagem dos pais (ou mesmo a análise de DNA dos avós) poderiam auxiliar na definição.

Apesar da atividade enzimática dos pacientes sintomáticos 35, 36 e 37 não se enquadrar como DB total ou parcial, o tratamento com biotina foi iniciado após terem sido excluídos outros quadros genéticos pela equipe assistente, uma vez que eles apresentam manifestações clínicas compatíveis com DB e não é conhecida toxicidade causada pela biotina. Infelizmente, não temos conhecimento se houve alguma melhora com o tratamento. Esses pacientes podem ser casos de manifestação tardia da DB, mas a ausência de variantes nos éxons 2-4 do gene *BTD* sugere que eles não têm BD.

O paciente sintomático 38 teve intervenção mais precoce em relação ao paciente 34, o qual também apresenta genótipo e atividade enzimática correspondente à DB total, e isso deve ter contribuído para que ele

apresentasse quadro mais leve - dermatite e convulsões resolveram, permanecendo sequela visual, como normalmente observado (Wastell et al., 1984, Wolf, 2000 [Updated 2013 Dec 5], Weber et al., 2004). Este exemplo reforça a importância do conhecimento dos profissionais da saúde sobre doenças metabólicas para um encaminhamento adequado e definição do diagnóstico em um curto período de tempo.

A mutação p.[D444H;A171T], terceira mais frequente entre pacientes triados, não foi vista em pacientes diagnosticados por suspeita clínica, assim como em outro estudo (Norrgard et al., 1999). Entretanto, nenhuma inferência pode ser feita devido ao pequeno número de participantes identificados por suspeita clínica. Por esse mesmo motivo, não foi possível fazer qualquer correlação entre genótipo e manifestação clínica.

O paciente 15 é um caso interessante, uma vez que ele apresentou atividade da biotinidase muito baixa em período próximo à triagem neonatal, mas ela gradativamente alcançou o intervalo normal, como esperado para o genótipo dele. Acreditamos que a ampla variação nos níveis de atividade enzimática apresentada por esse paciente é principalmente explicada pela prematuridade e icterícia que ele apresentou no início da vida. Entretanto, como o primeiro teste quantitativo foi realizado quando ele tinha apenas cinco dias de vida e o último quando ele tinha um ano de idade, parte da variação pode ser explicada pelo avanço da idade.

Entre as crianças que realizaram apenas o teste em papel-filtro (com deficiência não discriminada), 6/9 são homozigotas para p.D444H, que resulta em atividade semelhante à de heterozigotos para outros alelos e não tem implicações clínicas. Esse dado confirma que outra metodologia precisa ser usada (teste enzimático quantitativo ou análise genética) para confirmação dos resultados desta técnica (Wolf, 2012).

Em relação às variantes novas, algumas inferências puderam ser feitas. Com base na frequência alélica das variantes novas c.119T>C (p.L40P) e c.479G>A (p.C160Y) em controles, na predição de patogenicidade por bioinformática, e levando em consideração também a atividade enzimática associada, esses alelos foram considerados provavelmente patogênicos e os pacientes 02 e 18, os quais são heterozigotos compostos para p.D444H,

provavelmente têm DB parcial. Apesar da variante c.119T>C (p.L40P) não afetar a porção peptídica que constitui a proteína madura, o fato de alterar a constituição do peptídeo sinal talvez prejudique o endereçamento da enzima para vesículas secretórias (resultando em atividade enzimática reduzida no plasma). Alelos de deficiência total que afetam a mesma região já foram previamente descritos (Pomponio et al., 1995, Pomponio et al., 1997). O efeito da c.664G>A (p.D222N) sobre a funcionalidade da biotinidase é incerto por predição bioinformática, uma vez que os dois programas utilizados apresentaram conclusões contraditórias em relação à essa variante. Entretanto, a ausência dessa alteração em controles é um indicativo de que a mesma é provavelmente patogênica e portanto, o fenótipo do paciente 23 deve ser de heterozigose.

Na amostra estudada, verificou-se que a taxa de consanguinidade (5,3%) foi apenas um pouco superior àquela descrita para a população geral do Brasil (1,6%) (Liascovich et al., 2001). Então, os casos de atividade da biotinidase reduzida não estão expressivamente vinculados a consanguinidade parental, e isso é um indício de que a frequência de alelos patogênicos é alta na população. Verificou-se que o alelo C da variante c.1330G>C (p.D444H) constitui 4% dos alelos em indivíduos saudáveis, frequência próxima à encontrada na população dos EUA (Norrgard et al., 1998, Bell et al., 2011), onde a incidência da DB total foi estimada em 1:80.000 NV e da DB parcial entre 1:31.000-1:40.000 NV (Cowan et al., 2010), e do oeste da Hungria (Milankovics et al., 2010), onde a incidência da DB total é 1:97.000 NV e da DB parcial é 1:23.000 NV (Milankovics et al., 2010). Os dados sugerem, portanto, que a incidência da DB parcial no Brasil também pode ser mais elevada do que a estimativa mundial (1:129.282 NV (Wolf, 1991)).

Em relação às duas variantes não patogênicas polimórficas encontradas em indivíduos controles, c.1171C>T ou p.P391S (rs35034250) e c.1413T>C ou p.C471C (rs3817641), frequências são similares àsquelas encontradas em outras populações de origem europeia e africana (available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). A variante p.P391S, que aparentemente teria um considerável efeito sobre a atividade enzimática devido à substituição de aminoácidos, foi predita como tolerada e já foi observado que a presença dela não altera a atividade da biotinidase. Tal alteração se localiza

em um trecho de aminoácidos predito como uma região de conexão entre os dois domínios da enzima (Hymes et al., 2001, Pindolia et al., 2010).

12 PERSPECTIVAS

Como continuidade dessa pesquisa, é importante que estudos futuros sejam delineados para analisarem os aspectos abaixo relacionados:

- Pesquisa de alterações no éxon 1 e íntrons do gene *BTD*, especialmente nos pacientes sem variantes identificadas. Embora ainda não tenham sido descritas na literatura, existe a possibilidade de alterações nessas regiões do gene serem encontradas, pois essas regiões nunca foram analisadas em pacientes brasileiros.

- Estudo de expressão das variantes descritas aqui pela primeira vez por mutagênese sítio dirigida, o que poderia contribuir para melhor entendimento do efeito dessas alterações genéticas sobre a atividade da enzima.

- Avaliação epigenética em indivíduos com DB total, DB parcial e heterozigotos, por estudo da metilação do DNA e biotilação de histonas.

- Avaliação haplotípica da variante p.D444H, avaliando a possibilidade de efeito fundador e região *hotspot* para a alteração.

13 CONCLUSÕES

As conclusões do trabalho serão apresentadas por objetivo.

Objetivo primário:

“Caracterizar o perfil clínico e genético (por análise do gene BTB) de uma amostra de pacientes brasileiros com atividade enzimática da biotinidase reduzida.”

A genotipagem de pacientes brasileiros com atividade da biotinidase reduzida ampliou a heterogeneidade alélica já descrita para a DB e mostrou boa concordância entre genótipo e fenótipo bioquímico. A alta frequência da variante característica da DB parcial, p.D444H, em pacientes e controles sugere que essa deve ser a forma de DB mais comum no Brasil e que a incidência da DB parcial no país pode ser mais elevada do que a estimativa mundial.

Objetivos secundários:

“I. Identificar as variantes mais frequentes do gene BTB.”

As variantes mais frequentemente encontradas nos pacientes foram p.D444H, p.D252G e p.[D444H;A171T], cujas frequências alélicas foram 50%, 9,4% e 5,4%, respectivamente.

“II. Comparar a frequência das variantes entre os dois grupos: pacientes identificados por triagem neonatal e pacientes identificados por suspeita clínica.”

Nenhuma inferência consistente pode ser feita devido ao pequeno número de participantes identificados por suspeita clínica.

“III. Verificar a relação entre genótipo e fenótipo bioquímico.”

Uma boa correlação entre o fenótipo bioquímico e o genótipo foi observada, entretanto, quando a atividade enzimática é próxima do limite entre DB parcial e heterozigose, o sequenciamento do gene *BTB* (iniciando a análise

pelos éxons 2 e 4) parece ser a técnica mais adequada para esclarecimento do diagnóstico na população brasileira.

“IV. Demonstrar o efeito patogênico ou não patogênico de variantes que forem descritas pela primeira vez, através de análises in silico e da frequência alélica em indivíduos controles.”

Com base na frequência alélica das variantes novas p.L40P e p.C160Y em controles, na predição de patogenicidade por bioinformática, e levando em consideração também a atividade enzimática associada, esses alelos foram considerados provavelmente patogênicos. O efeito da p.D222N sobre a funcionalidade da biotinidase é incerto por predição bioinformática, mas a ausência dessa alteração em controles é um indicativo de que a mesma é provavelmente patogênica.

“V. Estimar na população, a partir de uma amostra de indivíduos controles, a frequência da variante p.D444H e prever o efeito dela na funcionalidade da proteína por análise in silico.”

Verificou-se a variante p.D444H é polimórfica na população do sul do Brasil, com frequência alélica de 4% em indivíduos saudáveis. A análise *in silico* confirmou seu efeito patogênico.

14 REFERÊNCIAS

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7: 248-249
- Baez-Saldana A, Diaz G, Espinoza B, Ortega E (1998) Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *Am J Clin Nutr* 67: 431-437
- Baumgartner MR, Suormala T (2012) Biotin-responsive Disorders. In: Saudubray J-M, et al. (eds) *Inborn Metabolic Diseases*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 375-384
- Bay LB, de Pinho S, Eiroa HD, Otegui I, Rodriguez R (2010) [The importance of a law on time: presentation of a girl with biotinidase deficiency who was not picked up through the neonatal screening]. *Arch Argent Pediatr* 108: e13-16
- Baykal T, Gokcay G, Gokdemir Y, Demir F, Seckin Y, Demirkol M, Jensen K, Wolf B (2005) Asymptomatic adults and older siblings with biotinidase deficiency ascertained by family studies of index cases. *J Inher Metab Dis* 28: 903-912
- Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, Hateley SL, Ganusova EE, Mudge J, Langley RJ, Zhang L, Lee CC, Schilkey FD, Sheth V, Woodward JE, Peckham HE, Schroth GP, Kim RW, Kingsmore SF (2011) Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med* 3: 65ra64
- Chauhan J, Dakshinamurti K (1986) Purification and characterization of human serum biotinidase. *J Biol Chem* 261: 4268-4275
- Cole H, Reynolds TR, Lockyer JM, Buck GA, Denson T, Spence JE, Hymes J, Wolf B (1994) Human serum biotinidase. cDNA cloning, sequence, and characterization. *J Biol Chem* 269: 6566-6570
- Combs GF (2008) Biotin. *The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. Elsevier Academic Press San Diego, pp. 331–344
- Cowan TM, Blitzler MG, Wolf B, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance C (2010) Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency. *Genet Med* 12: 464-470
- Eakin RE, McKinley WA, Williams RJ (1940) Egg-white injury in chicks and its relationship to a deficiency of vitamin H (biotin). *Science* 92: 224-225
- GAT-PNTN (2012) Triagem Neonatal para Deficiência de Biotinidase – Recomendações do Grupo de Assessoramento Técnico do Programa de Triagem Neonatal
- Gyorgy P, Rose CS, Eakin RE, Snell EE, Williams RJ (1941) Egg-white injury as the result of nonabsorption or inactivation of biotin. *Science* 93: 477-478
- Heard GS, Secor McVoy JR, Wolf B (1984) A screening method for biotinidase deficiency in newborns. *Clin Chem* 30: 125-127

Heard GS, Wolf B, Jefferson LG, Weissbecker KA, Nance WE, Secor McVory JR, Napolitano A, Mitchell PL, Lambert FW, Linyear AS (1986) Neonatal screening for biotinidase deficiency: Results of a 1-year pilot study. *The Journal of pediatrics* 108: 40-46

Hewlett J, Waisbren SE (2006) A review of the psychosocial effects of false-positive results on parents and current communication practices in newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 29: 677-682

Hymes J, Fleischhauer K, Wolf B (1995) Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem Mol Med* 56: 76-83

Hymes J, Stanley CM, Wolf B (2001) Mutations in BTBD9 causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat* 18: 375-381

Hymes J, Wolf B (1996) Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* 255: 1-11

Hymes J, Wolf B (1999) Human biotinidase isn't just for recycling biotin. *J Nutr* 129: 485S-489S

Iqbal F, Item CB, Vilaseca MA, Jalan A, Muhl A, Couce ML, Duat A, Delgado MP, Bosch J, Puche A, Campistol J, Pineda M, Bodamer OA (2010) The identification of novel mutations in the biotinidase gene using denaturing high pressure liquid chromatography (dHPLC). *Mol Genet Metab* 100: 42-45

Knight HC, Reynolds TR, Meyers GA, Pomponio RJ, Buck GA, Wolf B (1998) Structure of the human biotinidase gene. *Mamm Genome* 9: 327-330

Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4: 1073-1081

Kumasaka K, Muratsugu M, Fukui T, Kimura M, Takagi Y, Hashizume N (2001) A new quantitative analytical method of serum biotinidase activity using biocytin as a substrate and its clinical significance in Japan. *Clin Chim Acta* 306: 71-77

Lara MT (2010) Triagem Neonatal para deficiência de biotinidase no estado de Minas Gerais. Dissertação. Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 100

Liascovich R, Rittler M, Castilla EE (2001) Consanguinity in South America: demographic aspects. *Hum Hered* 51: 27-34

Livaniou E, Kakabakos SE, Evangelatos SA, Evangelatos GP, Ithakissios DS (1997) Determination of serum biotinidase activity with radioiodinated biotinylamide analogs. *Methods Enzymol* 279: 442-451

Luz GS, Carvalho MD, Pelloso SM, Higarashi IH (2008) [Prevalence of diseases diagnosed by the Program of Neonatal Screening in Maringa, Parana, Brazil: 2001-2006]. *Rev Gaucha Enferm* 29: 446-453

McVoy JR, Levy HL, Lawler M, Schmidt MA, Ebers DD, Hart PS, Pettit DD, Blitzer MG, Wolf B (1990) Partial biotinidase deficiency: clinical and biochemical features. *J Pediatr* 116: 78-83

Milankovics I, Nemeth K, Somogyi C, Schuler A, Fekete G (2010) High frequencies of biotinidase (BTD) gene mutations in the Hungarian population. *J Inherit Metab Dis* 33 Suppl 3: S289-292

Moslinger D, Muhl A, Suormala T, Baumgartner R, Stockler-Ipsiroglu S (2003) Molecular characterisation and neuropsychological outcome of 21 patients with profound biotinidase deficiency detected by newborn screening and family studies. *Eur J Pediatr* 162 Suppl 1: S46-49

Muhl A, Moslinger D, Item CB, Stockler-Ipsiroglu S (2001) Molecular characterisation of 34 patients with biotinidase deficiency ascertained by newborn screening and family investigation. *Eur J Hum Genet* 9: 237-243

National Research Council (1998) Biotin. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: *The National Academies Press* The National Academies Press

Neto EC, Schulte J, Rubim R, Lewis E, DeMari J, Castilhos C, Brites A, Giugliani R, Jensen KP, Wolf B (2004) Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. *Braz J Med Biol Res* 37: 295-299

Norrgard KJ, Pomponio RJ, Hymes J, Wolf B (1999) Mutations causing profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in the United States occur at different frequencies than in symptomatic children. *Pediatr Res* 46: 20-27

Norrgard KJ, Pomponio RJ, Swango KL, Hymes J, Reynolds T, Buck GA, Wolf B (1998) Double mutation (A171T and D444H) is a common cause of profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in the United States. *Mutations in brief no. 128*. Online. *Hum Mutat* 11: 410

PerkinElmer (2011) Neonatal biotinidase kit. Wallac Oy, Turku, Finland.
Pindolia K, Jensen K, Wolf B (2007) Three dimensional structure of human biotinidase: computer modeling and functional correlations. *Mol Genet Metab* 92: 13-22

Pindolia K, Jordan M, Wolf B (2010) Analysis of mutations causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat* 31: 983-991

Pinto AL, Raymond KM, Bruck I, Antoniuk SA (1998) [Prevalence study of biotinidase deficiency in newborns]. *Rev Saude Publica* 32: 148-152

Pollitt RJ, Green A, McCabe CJ, Booth A, Cooper NJ, Leonard JV, Nicholl J, Nicholson P, Tunaley JR, Virdi NK (1997) Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome. *Health Technol Assess* 1: i-iv, 1-202

Pomponio RJ, Coskun T, Demirkol M, Tokatli A, Ozalp I, Huner G, Baykal T, Wolf B (2000a) Novel mutations cause biotinidase deficiency in Turkish children. *J Inherit Metab Dis* 23: 120-128

Pomponio RJ, Hymes J, Pandya A, Landa B, Melone P, Javaheri R, Mardach R, Morton SW, Meyers GA, Reynolds T, Buck G, Nance WE, Wolf B (1998) Prenatal diagnosis of heterozygosity for biotinidase deficiency by enzymatic and molecular analyses. *Prenat Diagn* 18: 117-122

Pomponio RJ, Ozand PT, Al Essa M, Wolf B (2000b) Novel mutations in children with profound biotinidase deficiency from Saudi Arabia. *J Inher Metab Dis* 23: 185-187

Pomponio RJ, Reynolds TR, Cole H, Buck GA, Wolf B (1995) Mutational hotspot in the human biotinidase gene causes profound biotinidase deficiency. *Nat Genet* 11: 96-98

Pomponio RJ, Reynolds TR, Mandel H, Admoni O, Melone PD, Buck GA, Wolf B (1997) Profound biotinidase deficiency caused by a point mutation that creates a downstream cryptic 3' splice acceptor site within an exon of the human biotinidase gene. *Hum Mol Genet* 6: 739-745

Procter M, Wolf B, Crockett DK, Mao R (2013) The Biotinidase Gene Variants Registry: A Paradigm Public Database. *G3 (Bethesda)* 3: 727-731

Rodriguez-Melendez R, Zemleni J (2003) Regulation of gene expression by biotin (review). *J Nutr Biochem* 14: 680-690

Said HM (2009) Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption. *J Nutr* 139: 158-162

Salbert BA, Astruc J, Wolf B (1993) Ophthalmologic findings in biotinidase deficiency. *Ophthalmologica* 206: 177-181

Schulpis KH, Gavrilis S, Tjamouranis J, Karikas GA, Kapiki A, Costalos C (2003) The effect of neonatal jaundice on biotinidase activity. *Early Human Development* 72: 15-24

Schulte J (2003) Estudo da estabilidade térmica e temporal da atividade de biotinidase em amostras de sangue (papel-filtro, plasma e soro). Dissertação. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 67

Sivri HS, Genc GA, Tokatli A, Dursun A, Coskun T, Aydin HI, Sennaroglu L, Belgin E, Jensen K, Wolf B (2007) Hearing loss in biotinidase deficiency: genotype-phenotype correlation. *J Pediatr* 150: 439-442

Stanley CM, Hymes J, Wolf B (2004) Identification of alternatively spliced human biotinidase mRNAs and putative localization of endogenous biotinidase. *Mol Genet Metab* 81: 300-312

Suormala T, Wick H, Baumgartner ER (1988) Low biotinidase activity in plasma of some preterm infants: possible source of false-positive screening results. *Eur J Pediatr* 147: 478-480

Swango KL, Demirkol M, Huner G, Pronicka E, Sykut-Cegielska J, Schulze A, Mayatepek E, Wolf B (1998) Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene. *Hum Genet* 102: 571-575

Thibodeau DL, Andrews W, Meyer J, Mitchell P, Wolf B (1993) Comparison of the effects of season and prematurity on the enzymatic newborn screening tests for galactosemia and biotinidase deficiency. *Screening* 2: 19-27

Thodi G, Schulpis KH, Molou E, Georgiou V, Loukas YL, Dotsikas Y, Papadopoulos K, Biti S (2013) High incidence of partial biotinidase deficiency cases in newborns of Greek origin. *Gene* 524: 361-362

Wastell H, Dale G, Bartlett K (1984) A sensitive fluorimetric rate assay for biotinidase using a new derivative of biotin, biotinyl-6-aminoquinoline. *Anal Biochem* 140: 69-73

Wastell HJ, Bartlett K, Dale G, Shein A (1988) Biotinidase deficiency: a survey of 10 cases. *Arch Dis Child* 63: 1244-1249

Weber P, Scholl S, Baumgartner ER (2004) Outcome in patients with profound biotinidase deficiency: relevance of newborn screening. *Dev Med Child Neurol* 46: 481-484

Wolf B (1991) Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inher Metab Dis* 14: 923-927

Wolf B (2000 [Updated 2013 Dec 5]) Biotinidase Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al. (eds) *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle

Wolf B (2003) Biotinidase Deficiency: New Directions and Practical Concerns. *Curr Treat Options Neurol* 5: 321-328

Wolf B (2010) Clinical issues and frequent questions about biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 100: 6-13

Wolf B (2012) Biotinidase deficiency: "if you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have". *Genet Med* 14: 565-575

Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL (1983a) Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* 131: 273-281

Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL, Parker WD, Howell DM, Hurst DL (1983b) Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *J Pediatr* 103: 233-237

Wolf B, Jensen K, Huner G, Demirkol M, Baykal T, Divry P, Rolland MO, Perez-Cerda C, Ugarte M, Straussberg R, Basel-Vanagaite L, Baumgartner ER, Suormala T, Scholl S, Das AM, Schweitzer S, Pronicka E, Sykut-Cegielska J (2002a) Seventeen novel mutations that cause profound biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 77: 108-111

Wolf B, Jensen KP, Barshop B, Blitzer M, Carlson M, Goudie DR, Gokcay GH, Demirkol M, Baykal T, Demir F, Quary S, Shih LY, Pedro HF, Chen TH, Slonim AE (2005) Biotinidase deficiency: novel mutations and their biochemical and clinical correlates. *Hum Mutat* 25: 413

Wolf B, Norrgard K, Pomponio RJ, Mock DM, McVoy JR, Fleischhauer K, Shapiro S, Blitzer MG, Hymes J (1997) Profound biotinidase deficiency in two asymptomatic adults. *Am J Med Genet* 73: 5-9

Wolf B, Pomponio RJ, Norrgard KJ, Lott IT, Baumgartner ER, Suormala T, Ramaekers VT, Coskun T, Tokatli A, Ozalp I, Hymes J (1998) Delayed-onset profound biotinidase deficiency. *J Pediatr* 132: 362-365

Wolf B, Spencer R, Gleason T (2002b) Hearing loss is a common feature of symptomatic children with profound biotinidase deficiency. *J Pediatr* 140: 242-246

Ye J, Wang T, Han LS, Qiu WJ, Zhang HW, Zhang YF, Gao XL, Wang Y, Gu XF (2009) Diagnosis, treatment, follow-up and gene mutation analysis in four Chinese children with biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 32 Suppl 1: S295-302

Zempleni J, Mock DM (2000) Utilization of biotin in proliferating human lymphocytes. *J Nutr* 130: 335S-337S

15 ANEXOS

15.1 Anexo I



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 120186

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

TACIANE BORSATTO

Título: Avaliação genética e aspectos clínicos de pacientes brasileiros com deficiência de biotinidase


Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 18 de julho de 2012.



Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG

15.2 Anexo II



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 130415

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

SANDRA LEISTNER SEGAL

FERNANDA SPERB LUDWIG

TACIANE BORSATTO

Título: Frequência de variantes do gene BTB em amostra da população do sul do Brasil

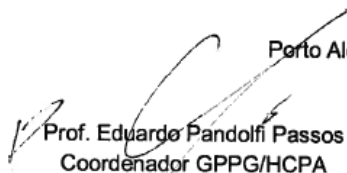
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 18 de novembro de 2013.


Prof. Eduardo Pandolfi Passos
Coordenador GPPG/HCPA

16 APÊNDICES

16.1 Apêndice I

Formulário de dados

Projeto: *Avaliação genética e aspectos clínicos de pacientes brasileiros com deficiência de biotinidase.*

Laboratório BRAIN - Centro de Pesquisas Experimentais - HCPA

Formulário preenchido por: _____

Data: ___ / ___ / _____

Identificação

Nome do paciente: _____

Sexo: () fem () masc

Data de nascimento: ___ / ___ / _____

Idade: _____

Etnia: () euro-desc. () afro-desc. () indígena Outro: _____

Nome do pai: _____

Nome da mãe: _____

Cosanguinidade: () sim () não

Contato

Cidade: _____ UF: _____

Rua: _____ N° _____ compl. _____

Telefone: () _____

Informações Clínicas

Diagnosticado por: () triagem neonatal
() rastreamento familiar
() suspeita clínica

Atividade enzimática da biotinidase*:

Paciente: _____

Pai: _____

Mãe: _____

} Unidade de medida: _____

* no caso de vários testes, informe o maior valor.

Atividade da biotinidase foi medida em:

() papel filtro () plasma/soro () outro: _____

Laboratório: _____

Média da atividade normal: _____

Intervalos de referência (IR):

IR normal: _____

IR deficiência parcial: _____

IR deficiência total: _____

Os IR correspondem a: () amplitude () ± 2 DP da média
Idade em que foi diagnosticado: _____() dias () semanas () meses () anos

Prematuridade: () sim () não
Relato de icterícia: () sim () não

Há outros casos da doença na família: () não () sim
Quem: _____

Tratamento com biotina: () não () sim
Dose (atual): _____mg

Apresenta sintomas, atualmente: () sim não ()
Apresentou sintomas, no passado: () sim não ()

Idade em que surgiram os primeiros sintomas: _____
() dias () semanas () meses () anos

() Assintomático

Sintomas atuais e/ou passados:

Problemas Neurológicos

- | | |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| () Fadiga | () Convulsões |
| () Hipotonia | () Retardo mental |
| () Atraso motor | () Coma |
| () Regressão motora | () Alteração no eletroencefalograma |
| () Fraqueza muscular motora | () Alteração na ressonância magnética
e/ou tomografia computadorizada do |
| () Ptose | cérebro |
| () Paresia espástica | () Alteração da mielografia |
| () Ataxia | () Atraso na fala |
| () Letargia | |

Problemas de audição

- () Perda auditiva

Problemas de visão

- () Perda da acuidade visual
() Escotoma
() Visão dupla
() Atrofia óptica

Problemas respiratórios

- () Apneia
() Taquipneia

Problemas metabólicos

- () Acidose metabólica
() Acidúria orgânica
() Lactado aumentado no líquido

Problemas Cutâneos

- () Lesões (*rash*) cutâneas –
() generalizada () localizada
() Eczema
() Infecção fúngica
() Escassez de cabelos
() Alopecia

Outros

- () Infecção do trato urinário
() Conjuntivite subclínica
() Problema gastrointestinal

() Hiperamonemia

() Outros sintomas:

Sintomas que permaneceram mesmo com o tratamento com biotina:

Dentre os que permaneceram, quais sintomas melhoraram com o tratamento com biotina:

Espaço para heredograma:

16.2 Apêndice II

Termo de consentimento livre e esclarecido I

Projeto: Avaliação genética e aspectos clínicos de pacientes brasileiros com deficiência de biotinidase.

Investigador Responsável: Dra. Ida Vanessa D. Schwartz. Serviço de Genética Médica do HCPA. Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre-RS. Tel.: (51) 3359-8309.

Paciente: _____

Prezado paciente (ou responsável),

A deficiência de biotinidase é uma doença genética em que existe um defeito no gene chamado *BTD*. Os genes são pequenas partes do DNA, o qual está dentro das células e é responsável pelas características delas. O gene *BTD* tem as informações para a produção da enzima biotinidase, por isso um defeito nele resulta na produção de biotinidase que não funciona normalmente. Essa enzima, defeituosa, não é capaz de obter a vitamina biotina a partir dos alimentos, e, na falta da vitamina, as células do corpo não funcionam bem. Devido ao seu diagnóstico de deficiência de biotinidase, você está sendo convidado para participar desta pesquisa. O objetivo desta pesquisa é verificar as alterações presentes no DNA (gene *BTD*) e os sintomas de pessoas com essa doença.

Para a sua participação nesta pesquisa, será necessária a coleta de sangue para a análise do DNA. Caso você já tenha DNA coletado, não será necessário coletar novamente. Também serão obtidas informações clínicas sobre você, como os sintomas e uso de medicamento. Isso será feito através do preenchimento de um formulário pelo seu médico e por consulta aos registros médicos (seu prontuário).

RISCOS E BENEFÍCIOS

A coleta de sangue envolve o risco de desconforto, causado por uma picada com agulha, e eventual mancha roxa no local da picada.

Cabe salientar que, embora não haja cura, a deficiência de biotinidase possui um tratamento eficaz (medicamento de uso contínuo), e que, esta pesquisa não tem como finalidade a melhora dos pacientes. Não haverá benefício direto a você, apesar disso, as informações obtidas podem servir para melhorar o entendimento da doença e aprimorar o diagnóstico futuro de pacientes com deficiência de biotinidase.

CUSTO E REMUNERAÇÃO

Você não terá custos ao participar do estudo, assim como não receberá remuneração financeira por ter aceitado o convite. A sua participação ou recusa não irá alterar o atendimento recebido pelo médico e hospital.

PRESERVAÇÃO DA IDENTIDADE

Você tem direito à privacidade, todo esforço será feito para que a sua identidade não seja revelada. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, mas o seu nome não será revelado.

AUTORIZAÇÃO PARA CONSULTA DOS REGISTROS MÉDICOS

Por meio deste termo, você autoriza que os pesquisadores envolvidos neste estudo analisem os seus registros médicos a fim de obter as informações necessárias para a realização desta pesquisa.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital. A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo(a). Em qualquer caso, você não será penalizado(a).

RESULTADOS

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você receba os resultados dos exames realizados nesta pesquisa, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber os resultados dos testes quando estes estiverem disponíveis. Neste caso, você:

- deseja receber os resultados dos exames realizados nesta pesquisa.
- não deseja receber os resultados dos exames realizados nesta pesquisa.

POSSÍVEL USO POSTERIOR DA AMOSTRA

Se você permitir, o material coletado (sangue) que restar após a realização dos exames previstos neste estudo, será armazenado e utilizado em estudos futuros. Em relação ao armazenamento e utilização do material (sangue) que tenha restado, você declara que:

- autoriza que este material seja armazenado e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros, desde que você revise e assine o termo de consentimento de tais estudos.
- não autoriza que este material seja armazenado e não poderá vir a ser utilizado em estudos futuros. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado.

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz, no Serviço de Genética Médica do HCPA, e para esclarecimento de questões éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA através do telefone (51) 3359-8304.

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por _____ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo, bem como, que não terá custos em participar. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada. Enfim, declara que aceita participar da pesquisa

ciente da liberdade de não participar e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

Data: ____/____/____

Paciente: _____

Responsável legal: _____

Assinatura: _____

Eu expliquei a _____os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ____/____/____

Nome: _____

Assinatura: _____

16.3 Apêndice III

Termo de consentimento livre e esclarecido II

Projeto: Avaliação genética e aspectos clínicos de pacientes brasileiros com deficiência de biotinidase.

Investigador Responsável: Dra. Ida Vanessa D. Schwartz. Serviço de Genética Médica do HCPA. Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre-RS. Tel.: (51) 3359-8309.

Participante: _____

() pai () mãe do paciente: _____

Prezado(a) pai/mãe,

A deficiência de biotinidase é uma doença genética em que existe um defeito no gene chamado *BTD*. Os genes são pequenas partes do DNA, o qual está dentro das células e é responsável pelas características delas. O gene *BTD* tem as informações para a produção da enzima biotinidase, por isso um defeito nele resulta na produção de biotinidase que não funciona normalmente. Essa enzima, defeituosa, não é capaz de obter a vitamina biotina a partir dos alimentos, e, na falta da vitamina, as células do corpo não funcionam bem. Devido ao diagnóstico de deficiência de biotinidase do seu filho(a), você está sendo convidado para participar desta pesquisa. O objetivo desta pesquisa é verificar as alterações presentes no DNA (gene *BTD*) e os sintomas de pessoas com essa doença.

Para a sua participação nesta pesquisa, será necessária a coleta de sangue para a análise do DNA. A sua amostra somente será analisada no caso de necessidade de confirmação ou esclarecimento do resultado da análise do gene *BTD* do seu filho(a).

RISCOS E BENEFÍCIOS

A coleta de sangue envolve o risco de desconforto, causado por uma picada com agulha, e eventual mancha roxa no local da picada.

Cabe salientar que, embora não haja cura, a deficiência de biotinidase possui um tratamento eficaz (medicamento de uso contínuo), e que, esta pesquisa não tem como finalidade a melhora dos pacientes. Não haverá benefício direto a você, apesar disso, as informações obtidas podem servir para melhorar o entendimento da doença e aprimorar o diagnóstico futuro de pacientes com deficiência de biotinidase.

CUSTO E REMUNERAÇÃO

Você não terá custos ao participar do estudo, assim como não receberá remuneração financeira por ter aceitado o convite. A sua participação ou recusa não irá alterar o atendimento que você e seu filho(a) recebem pelo médico e hospital.

PRESERVAÇÃO DA IDENTIDADE

Você tem direito à privacidade, todo esforço será feito para que a sua identidade não seja revelada. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, mas o seu nome não será revelado.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o tratamento do seu filho(a) no hospital. A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo(a). Em qualquer caso, você não será penalizado(a).

RESULTADOS

A assinatura desse termo e o fornecimento da amostra de sangue não garantem que ela seja analisada, portanto, podem não ser gerados resultados para você. Caso sejam realizados exames, não existe um prazo exato ou estipulado para que você os receba os resultados, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis. Você pode optar por não saber os resultados dos testes quando estes estiverem disponíveis. Neste caso, você:

- deseja receber os resultados dos exames realizados nesta pesquisa.
- não deseja receber os resultados dos exames realizados nesta pesquisa.

POSSÍVEL USO POSTERIOR DA AMOSTRA

Se você permitir, o material coletado (sangue) que restar após a realização dos exames previstos neste estudo, será armazenado e utilizado em estudos futuros. Em relação ao armazenamento e utilização do material (sangue) que tenha restado, você declara que:

- autoriza que este material seja armazenado e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros, desde que você revise e assine o termo de consentimento de tais estudos.
- não autoriza que este material seja armazenado e não poderá vir a ser utilizado em estudos futuros. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado.

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz, no Serviço de Genética Médica do HCPA, e para esclarecimento de questões éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA através do telefone (51) 3359-8304.

Pelo presente termo, você declara que foi informado(a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por _____. Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo, bem como, que não terá custos em participar. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada. Enfim, declara que aceita participar da pesquisa ciente da liberdade de não participar e da possibilidade de desistir, em qualquer

momento, da participação. Além disso, declara que recebeu cópia deste termo de consentimento.

Data: ____/____/____

Participante: _____

Assinatura: _____

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ____/____/____

Nome: _____

Assinatura: _____