

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Estudo da associação entre genótipo e fenótipo na deficiência de
biotinidase**

Taciane Borsatto

Porto Alegre

Abril de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Estudo da associação entre genótipo e fenótipo na deficiência de
biotinidase**

Taciane Borsatto

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

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

Orientador no exterior: Prof. Dr. Henk J. Blom

Coorientadora: Dra. Fernanda Sperb Ludwig

Porto Alegre

Abril de 2018

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Esta tese é resultado da continuidade de um projeto de pesquisa iniciado pela aluna no seu Mestrado e do desenvolvimento de outros três projetos, todos 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 nos Anexos I ao IV).

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório *Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences* (BRAIN), localizado no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do HCPA, e no Laboratório de Bioquímica Clínica e Metabolismo do Centro Médico Universitário de Freiburg (Alemanha). Além disso, algumas análises foram realizadas pelos seguintes laboratórios: Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Uamp), Serviço de Patologia Clínica (SPC) e Laboratório de Referência para Erros Inatos do Metabolismo do HCPA.

A execução dos projetos e publicações foram financiados pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (MCTI/CNPq Nº 14/2013). O Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) financiou traduções e auxiliou participação da aluna em eventos. A aluna recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e bolsa de doutorado sanduíche do CNPq.

Dedico este trabalho a todos os pais, cuidadores e pacientes com doenças genéticas raras, em homenagem a sua garra, seja no processo de diagnóstico, tratamento ou atuação social.

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, e à coorientadora Dra. Fernanda Sperb-Ludwig, pela oportunidade de continuar minha capacitação em nível de doutorado, pelos ensinamentos, e oportunidade de diferentes experiências acadêmicas durante esta jornada.

Ao orientador no exterior, Dr. Henk Blom, pela receptividade, por ter feito com que eu me sentisse confortável nas atividades junto ao seu grupo de pesquisa, pela atenção dada ao meu trabalho e, obviamente, pelos ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório BRAIN, pela troca de experiências. Cada um que conheci neste período deixou o melhor de si em mim. Agradeço, em especial, às colegas que se tornaram queridas amigas, Suélen Basgalupp, Giovana Weber Hoss, Franciele Cabral Pinheiro e Karina Colonetti pela parceria no dia-a-dia no laboratório, pelo conforto nas dificuldades e também pelas boas risadas. Vocês são presentes do Doutorado para a minha vida pessoal.

Aos meus pais, Agenor Borsatto e Idalena D. Borsatto, pela compreensão e amor incondicional.

Ao meu amor, Alexandre Felin Gindri, pelo apoio na carreira, encorajamento sempre que precisei e importantíssima parceria no período “sanduíche”.

Aos pais e pacientes que participaram da pesquisa, pela confiança e compreensão. Tenham certeza de que vocês foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese. Vocês são exemplares. Muito obrigada, com carinho.

SUMÁRIO

1	LISTA DE ABREVIATURAS	8
2	LISTA DE FIGURAS.....	9
3	LISTA DE TABELAS	10
4	RESUMO.....	11
5	ABSTRACT	13
6	INTRODUÇÃO	15
6.1	A biotinidase e o metabolismo da biotina.....	15
6.2	Deficiência de biotinidase	18
6.3	As vias das carboxilases dependentes de biotina.....	20
6.4	Manifestações clínicas.....	22
6.5	Bases genéticas da deficiência de biotinidase.....	24
6.5.1	A estrutura do gene <i>BTB</i> e da biotinidase.....	24
6.5.2	Variantes do gene <i>BTB</i>	25
6.5.3	Genótipo X fenótipo.....	26
6.6	Diagnóstico da deficiência de biotinidase	31
6.6.1	Triagem neonatal	31
6.6.2	Rastreamento familiar	34
6.6.3	Diagnóstico pré-natal e identificação de heterozigotos	34
6.6.4	Suspeita clínica	34
6.6.5	Fatores responsáveis por falsos-positivos e falsos-negativos.....	34
6.6.6	Exame complementar	36
6.6.7	Análise genética	36
6.7	Tratamento	37
6.8	Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para DB no Brasil.....	38
7	HIPÓTESE	40
8	JUSTIFICATIVA	41
8.1	Estudo da associação entre genótipo e fenótipo bioquímico com ampliação da análise do gene <i>BTB</i> e avaliação de fatores não genéticos ...	41
8.2	Estudo funcional de variantes gênicas.....	43
8.3	Avaliação bioquímica da DB parcial.....	44
9	OBJETIVOS	45
9.1	Objetivo geral.....	45

9.2	Objetivos específicos	45
10	CAPÍTULO 1: Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients	46
11	CAPÍTULO 2: Effect of <i>BTD</i> gene variants on <i>in vitro</i> biotinidase activity	66
12	CAPÍTULO 3: Plasma metabolites in patients with partial biotinidase deficiency	84
13	DISCUSSÃO	94
14	CONCLUSÕES	101
15	PERSPECTIVAS	104
16	REFERÊNCIAS	105
17	ANEXOS	117
17.1	Anexo I	117
17.2	Anexo II	118
17.3	Anexo III	119
17.4	Anexo IV	120
18	APÊNDICES	121
18.1	Apêndice I	121
18.2	Apêndice II	124

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

EIMs: Erros Inatos do Metabolismo

BTD: biotinidase

CoA: coenzima A

DB: deficiência de biotinidase

NV: nascidos vivos

Ex: éxon

Int: íntron

UTR: *untranslated region*

aa: aminoácidos

HACL1: *2-hydroxyacyl-CoA lyase 1*

COLQ: *collagen like tail subunit of asymmetric acetylcholinesterase*

EUA: Estados Unidos da América

T: triagem neonatal

S: sintomatologia

N: tamanho amostral

PNTN: Programa Nacional de Triagem Neonatal

PABA: ácido para-aminobenzóico

PIG: pequenos para a idade gestacional

AMP: monofosfato de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

AMPK: proteína quinase ativada por AMP

2 LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da biotina e da biocitina.....	16
Figura 2. O ciclo da biotina.....	17
Figura 3. Rotas metabólicas onde atuam as carboxilases dependentes de biotina.....	22
Figura 4. Estrutura do gene <i>BTD</i> , mRNA e biotinidase.....	25
Figura 5. Resumo das bases moleculares da deficiência de biotinidase (DB)..	27
Figura 6. Ensaio quantitativo da atividade da biotinidase.....	33

3 LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência da deficiência de biotinidase em nível mundial, nacional e estadual.....20

Tabela 2. Variantes mais frequentes no gene *BTD*, encontradas em pacientes com DB total e parcial em dois importantes estudos.....28

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.....30

4 RESUMO

A deficiência de biotinidase (DB) é uma doença autossômica recessiva na qual estão prejudicadas a obtenção da vitamina biotina a partir da dieta e a reciclagem da mesma, levando à deficiência de carboxilases dependentes de biotina. As manifestações clínicas incluem problemas neuropsicomotores, dermatológicos e metabólicos. O diagnóstico da DB pode ser feito a partir de triagem neonatal, sendo que a confirmação é dada pela medida da atividade da biotinidase sérica. A DB pode ser total (atividade da biotinidase <10%) ou parcial (atividade da biotinidase entre 10-30%). O gene que codifica a biotinidase, *BTD*, é composto por 44kb, e alguns genótipos específicos foram associados com determinados fenótipos bioquímicos (ou classes enzimáticas: DB total, DB parcial, heterozigoto, normal). Entretanto, podem ser verificadas discordâncias entre o fenótipo esperado de acordo com o genótipo e o fenótipo de fato observado. Além disso, há controvérsias em relação aos benefícios da triagem e tratamento preventivo da forma parcial da deficiência. **Objetivo:** Este trabalho teve por objetivo estudar a associação entre genótipo e fenótipo na DB. **Métodos:** *Etapa 1)* Sequenciamento do gene *BTD* (região promotora, 5'UTR, éxons 1 a 4 e avaliação de fatores não genéticos relacionados à atividade da biotinidase em 72 indivíduos com atividade reduzida da biotinidase. *Etapa 2)* Estudo funcional de variantes gênicas descritas pela primeira vez por Borsatto *et al.* (2014, 2017) (c.119T>C, c.479G>A, c.664G>A, e c.1337T>C e c.1466A>G) e da variante mais comum na DB (c.1330G>C). *Etapa 3)* Avaliação de metabólitos (ácidos graxos, aminoácidos, colesterol total, triglicerídeos, glicose e insulina) em plasma de 14 pacientes com DB parcial e de 19 controles, na busca de evidências que reforçariam a indicação de tratamento na DB parcial. **Resultados:** *Etapa 1)* Foram identificadas três variantes novas (c.1337T>C, c.1466A>G e c.962G>A). A concordância entre o fenótipo bioquímico esperado (conforme genótipo) e o observado ocorreu em aproximadamente 70% dos casos. As variantes encontradas na região promotora (c.-514C>T, c.-315A>G e c.-183G>A), icterícia neonatal, prematuridade e transporte da amostra de plasma parecem não ter sido as principais causas das discordâncias entre fenótipo esperado e fenótipo observado. A atividade da biotinidase pode aumentar entre a primeira e

segunda coleta (período neonatal). A inconsistência na associação genótipo-fenótipo bioquímico reforça a orientação de que a DB deve ser diagnosticada com base na medida da atividade da biotinidase. A análise genética tem utilidade principalmente na diferenciação entre DB parcial e heterozigose. *Etapa 2)* Os resultados sugerem que as variantes novas c.119T>C, c.479G>A e c.1337T>C são deletérias, e que as variantes c.664G>A, c.1466A>G e c.1330G>C não são deletérias. Apesar disso, a variante c.1466A>G pode estar associada a DB parcial e o mecanismo de patogenicidade da c.1330G>C pode estar relacionado à instabilidade da enzima. *Etapa 3)* Dentre os analitos pesquisados, não foram identificadas alterações metabólicas em indivíduos com DB parcial e, portanto, o estudo falhou em mostrar evidências que reforcem o caráter patogênico da DB parcial.

Palavras-chave: biotinidase; associação genótipo-fenótipo; expressão *in vitro*; avaliação bioquímica; metabólitos.

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. Clinical manifestations include neurological, dermatological and metabolic abnormalities. The diagnosis of BD can be made by neonatal screening, and the confirmation is given by the measurement of serum biotinidase activity. BD may be profound (biotinidase activity <10%) or partial (biotinidase activity between 10-30%). The gene that codes for biotinidase, *BTD*, comprises 44kb, and some genotypes correlate with certain biochemical phenotypes (or enzymatic classes: total DB, partial DB, heterozygous, normal). However, disagreements between the expected phenotype (according to genotype) and observed phenotype can be seen. In addition, there are controversies regarding the benefits of screening and preventive treatment of the partial form of BD. **Objective:** The objective of this thesis was to study the association between genotype and phenotype in BD. **Methods:** *Step 1*) Sequencing of *BTD* gene (promoter region, 5'UTR and exons 1 to 4 and the evaluation of non-genetic factors related to biotinidase activity in 72 individuals with reduced biotinidase activity. *Step 2*) Functional study of novel genetic variants described by Borsatto *et al.* (2014, 2017) (c.119T>C, c.479G>A, c.664G>A, c.1337T>C and c.1466A>G) and the most common variant in BD(c.1330G>C). *Step 3*) Evaluation of metabolites (fatty acids, amino acids, total cholesterol, triglycerides, glucose and insulin) in plasma samples of 14 patients with partial BD and 19 control individuals, in order to search for evidences that would reinforce the indication of treatment in partial BD. **Results:** *Step 1*) Three novel variants were identified (c.1337T>C, c.1466A>G e c.962G>A). The agreement between the expected and the observed biochemical phenotype occurred in approximately 70% of cases. The variants found in the promoter region (c.-514C>T, c.-315A>G and c.-183G>A), neonatal jaundice, prematurity, and transport of the plasma sample were not the major causes of disagreement between expected and observed phenotype. Biotinidase activity may increase between the first and second collection (neonatal period). The inconsistency in the genotype-biochemical phenotype association reinforces the orientation that the BD should be diagnosed based

on the measurement of biotinidase activity. Genetic analysis has utility mainly in the differentiation between partial BD and heterozygosis. *Step 2)* The results suggest that the novel variants c.119T>C, c.479G>A and c.1337T>C are deleterious, and that the c.664G>A, c.1466A>G and c.1330G>C variants are not deleterious. Despite that, the c.1466A>G variant may be associated with partial DB and the mechanism of pathogenicity of c.1330G>C may be related to enzyme instability. *Step 3)* No metabolic changes were verified in individuals with partial BD, therefore the study failed to show evidence to reinforce the pathogenicity of partial DB.

Keywords: biotinidase; genotype-phenotype association; *in vitro* expression; biochemical evaluation; metabolites.

6 INTRODUÇÃO

Erros Inatos do Metabolismo (EIMs) são doenças causadas por defeitos genéticos que afetam o funcionamento normal de proteínas (enzimas, proteínas transportadoras) envolvidas em reações químicas que ocorrem como parte do processo contínuo de degradação e renovação de moléculas necessárias para o funcionamento do organismo. A manifestação clínica dos EIMs decorre do acúmulo tóxico do substrato, de intermediários gerados em vias metabólicas alternativas, da deficiência do produto da reação, ou pela combinação dessas alterações metabólicas. Mais de 500 doenças hereditárias são consideradas EIMs. Os primeiros sinais e sintomas ocorrem, em geral, durante o período neonatal e na infância, podendo também afetar jovens e adultos. São doenças de manifestação clínica heterogênea, em que na maioria das vezes falta uma correlação clara entre a gravidade da mutação no locus afetado e o fenótipo (correlação genótipo-fenótipo), o que afeta a capacidade de prever o curso da doença. Fatores ambientais, epigenéticos e microbioma, bem como genes adicionais, são potenciais fatores modificadores de fenótipo (Vairo and Souza, 2013; Weiner, 2017). Os EIMs são condições individualmente raras (com incidências bastante variadas), entretanto sua frequência em conjunto é relevante, estimada em 1:700 a 1:3.000 nascimentos (Ezgu, 2016).

A deficiência da enzima biotinidase (devido a variações patogênicas no gene que codifica essa enzima, gene *BTD*) é um EIM cujas manifestações resultam da deficiência do produto da reação, a vitamina biotina. Níveis insuficientes de biotina causam deficiência na atividade de carboxilases que utilizam a biotina como coenzima. Essas carboxilases estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos, glicose e lipídeos, por isso o metabolismo energético está prejudicado neste EIM.

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 os níveis de biotina do hospedeiro). A maioria dos alimentos contém a vitamina biotina na forma livre e ligada à proteína. Alimentos como fígado, rins, gema de ovo, alguns legumes e leite, representam importantes fontes dessa vitamina. A quantidade de biotina nos alimentos e a biodisponibilidade são variáveis. (Combs, 2008).

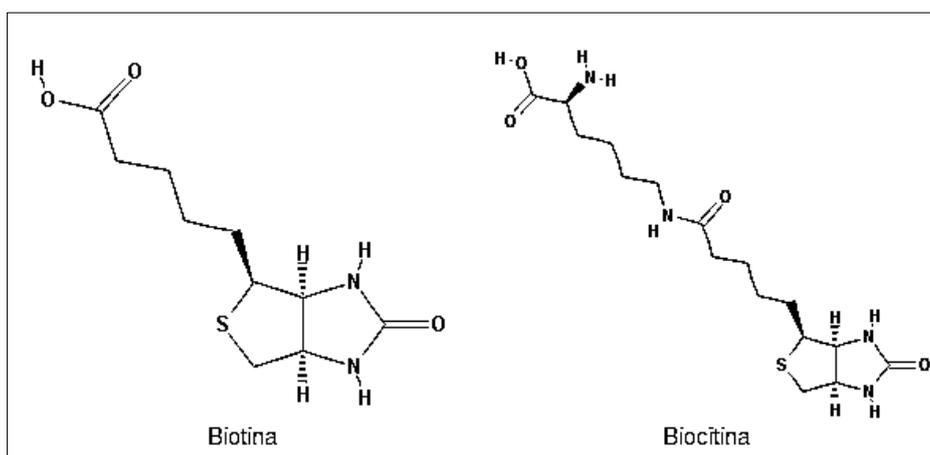


Figura 1. Estrutura química da biotina e da biocitina. Biocitina (biotinil-L-lisina) é a molécula resultante da ligação da biotina ao aminoácido lisina. Imagens obtidas de PubChem Compound Database (CID=83814 e CID=171548).

A fração de biotina que não está livre nos alimentos está ligada às proteínas através de uma ligação amida com um resíduo de lisina. As proteínas são digeridas 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), 3-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 de aminoácidos e gliconeogênese (figura 3). 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, 1999a; Wolf, 2003).

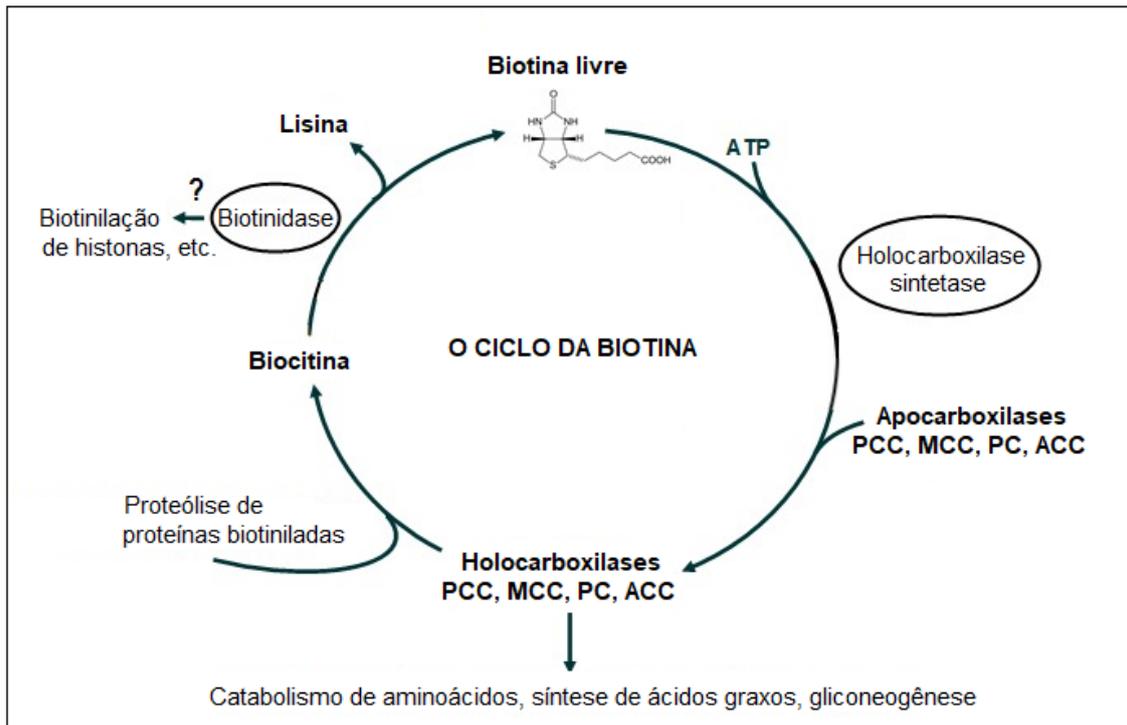


Figura 2. O ciclo da biotina. Biotina livre presente na dieta é absorvida e entra no ciclo diretamente, enquanto que biotina ligada às proteínas precisa sofrer a ação da enzima bitinidase para ser liberada e absorvida. A biotina livre é ligada às apocarboxilases propionil-CoA carboxilase (PCC), 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (MCC), piruvato carboxilase (PC) e acetil-CoA carboxilase (ACC), formando holo-carboxilases ativas. Subsequentemente, as holo-carboxilases sofrem proteólise e depois, por ação da biotinidase, a biotina livre é reciclada. Adaptado de Wolf (2016).

No *turnover* das proteínas celulares, as holo-carboxilases são degradadas gerando biocitina e oligopeptídeos biotinilados. 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, foi mostrado que, *in vitro*, a biotinidase tem atividade biotinil-transferase: a biotinidase é capaz de transferir a biotina da biocitina para histonas (Chauhan and Dakshinamurti, 1986; Hymes *et al.*, 1995;

Hymes and Wolf, 1999a). Estudos sugerem 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 (Zemleni and Mock, 2000). Foi demonstrado que a biotinilação de histonas é um processo muito raro que ocorre de forma natural, e não somente *in vitro*. Entretanto, acredita-se que a holocarboxilase sintetase é a enzima responsável pela biotinilação de histonas *in vivo* (Kuroishi *et al.*, 2011).

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, chamada inicialmente de deficiência múltipla de carboxilases de início tardio, é uma doença metabólica com padrão de herança autossômico recessivo, na qual a atividade da enzima biotinidase é deficiente. Essa

deficiência acaba por prejudicar a obtenção de biotina contida na dieta e 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.*, 1983c).

A DB pode ser total ou parcial conforme a atividade enzimática em plasma ou soro: a DB total é caracterizada por menos de 10% da média da atividade 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 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). Entretanto, levantamentos posteriores com base em programas de triagem neonatal têm mostrado que a incidência é bastante variada entre os países (tabela 1). 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; Lara *et al.*, 2015).

Tabela 1. Incidência da deficiência de biotinidase em nível mundial, nacional e estadual (por nascidos-vivos)

	Indivíduos avaliados ¹	DB combinada	DB parcial	DB total	Referências
No mundo	8.532.617	1:60.089	1:129.282	1:112.271	Wolf (1991)
EUA	ND	-	1:31.000- 1:40.000	1:80.000	Cowan <i>et al.</i> (2010)
Michigan	3.329.431	1:14.539	1:16.533	1:101.779	Jay <i>et al.</i> (2015)
Canadá (Ontário)	1.043.895	1:15.000	-	-	Gannavarapu <i>et al.</i> (2015)
Itália	1.097.894	1:61.000	-	-	Porta <i>et al.</i> (2017)
Hungria (oeste)	1.070.000	1:18.700	1:23.000	1:97.000	Milánkovics <i>et al.</i> (2010)
Holanda	913.965	1:8.233	-	-	Wiltink <i>et al.</i> (2016)
Grécia	63.119	-	1:4.508	-	Thodi <i>et al.</i> (2013)
Turquia	ND	1:7.116	-	-	Karaca <i>et al.</i> (2015)
Brasil	198.694	1:9.000	-	-	Neto <i>et al.</i> (2004)
Paraná	125.000	1:62.500	1:125.000	1:125.000	Pinto <i>et al.</i> (1998)
	20.529	1:6.843	-	-	Luz <i>et al.</i> (2008)
Minas Gerais	182.891	1:22.861	-	-	Lara <i>et al.</i> (2015)

¹ Todos os levantamentos foram realizados a partir de triagem neonatal.

DB= deficiência de biotinidase; ND= não disponível.

6.3 As vias das carboxilases dependentes de biotina

Na DB ocorre incapacidade do organismo em usar a biotina fornecida pela dieta e em fazer a reciclagem da mesma. Dessa forma, o *pool* de biotina livre fica diminuído e ocorre deficiência múltipla de carboxilases dependentes de biotina. A figura 3 mostra as rotas metabólicas onde cada carboxilase atua, seus substratos, e produtos.

Durante a lipogênese, os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico são transportados para o citoplasma para formar ácidos graxos, e então triglicerídeos. A piruvato carboxilase é responsável pela reação anaplerótica mais importante: ela reabastece os níveis de oxaloacetato mitocondrial. Além disso, a piruvato carboxilase catalisa o passo inicial na gliconeogênese (Tong, 2013).

Ambas acetil-CoA carboxilase I e II produzem malonil-CoA a partir de acetil-CoA. A acetil-CoA carboxilase I está presente no citosol e regula a síntese de ácidos graxos. A acetil-CoA carboxilase II está localizada na membrana mitocondrial externa e, por sua produção de malonil-CoA e inibição da carnitina palmitoil transferase I, controla a oxidação de ácidos graxos (Tong, 2013).

A 3-metilcrotonil-CoA carboxilase catalisa um dos passos no catabolismo da leucina. A propionil-CoA carboxilase participa do catabolismo de vários

aminoácidos, ácidos graxos de cadeia ímpar e colesterol. Neste processo, a propionil-CoA carboxilase faz o reabastecimento anaplerótico de succinil-CoA no ciclo do ácido tricarboxílico (Tong, 2013; Wongkittichote *et al.*, 2017).

Pacientes com DB podem apresentar acidose cetolática e acidúria orgânica, como resultado do desequilíbrio do metabolismo energético (Wolf *et al.*, 1983c; Wastell *et al.*, 1988).

Tradicionalmente, a avaliação da razão substrato:produto é uma excelente maneira de determinar a deficiência funcional (atividade) de enzimas. O bloqueio das vias das carboxilases dependentes de biotina resulta em aumento da excreção urinária das acilcarnitinas correspondentes aos substratos acumulados. Foi verificado que adultos saudáveis submetidos à dieta deficiente em biotina apresentaram alteração nos níveis de acilcarnitinas correspondentes aos substratos e produtos das carboxilases dependentes de biotina, isto é, as razões substrato:produto (propionilcarnitina:metilmalonilcarnitina, 3-hidroxiisovalerilcarnitina:3-metilglutarilcarnitina e acetilcarnitina:malonilcarnitina) aumentaram durante a restrição de biotina. Essas razões, que são medidas indiretas da atividade das carboxilases, são indicativas do status de biotina (Bogusiewicz *et al.*, 2012).

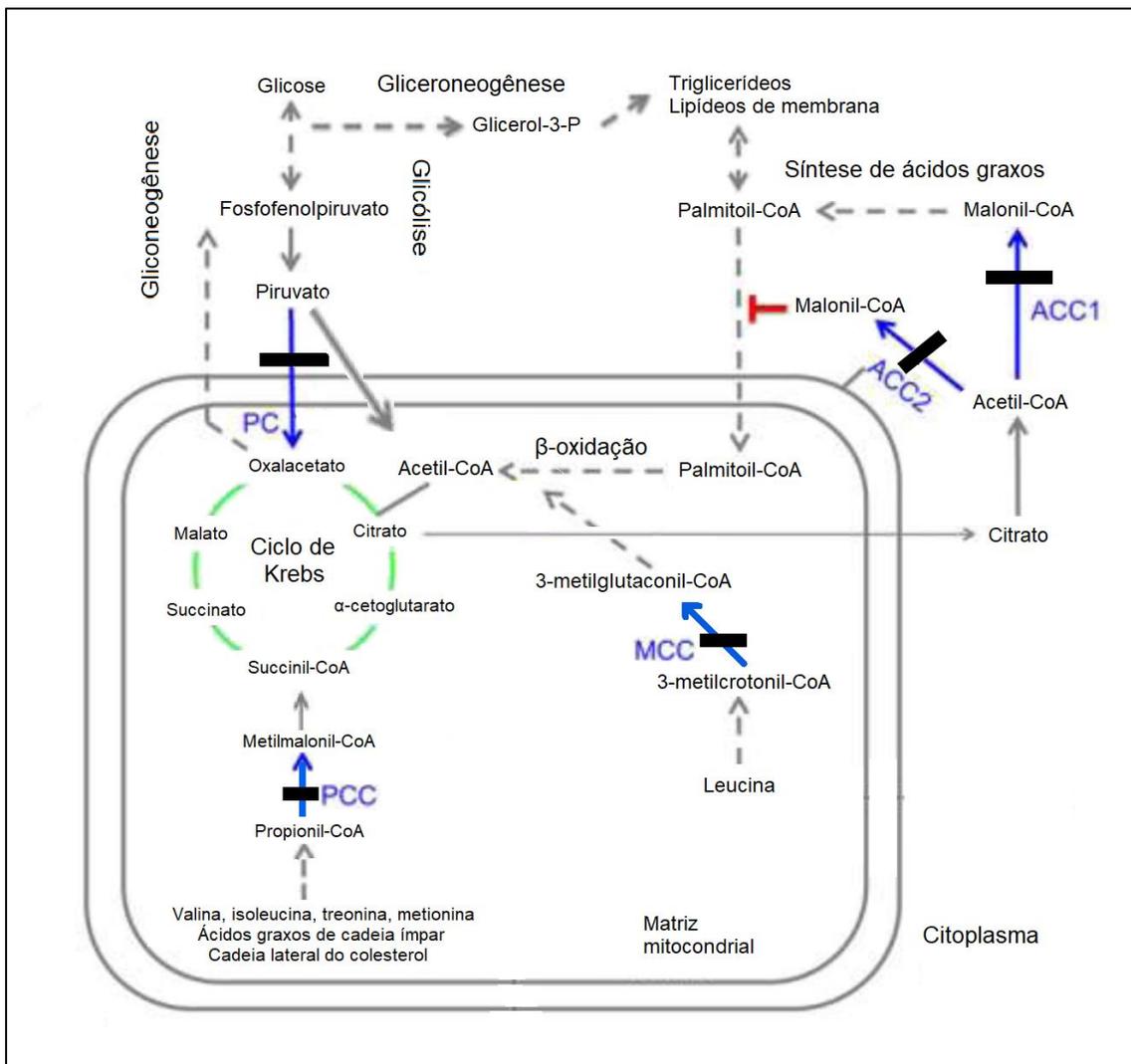


Figura 3. Rotas metabólicas onde atuam as carboxilases dependentes de biotina. PC: piruvato carboxilase, ACC1 e ACC2: acetil-coenzima A (CoA) carboxilase 1 e 2, MCC: 3-metilcrotonil-CoA carboxilase, PCC: propionil-CoA carboxilase. As barras pretas indicam o processo que está prejudicado (interrompido) em caso de níveis insuficientes de biotina. Setas com linhas sólidas indicam processo enzimático direto (único), enquanto que setas com linhas pontilhadas indicam várias etapas enzimáticas. Adaptado de Tong (2013).

6.4 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.*, 1983c). 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 neurossensorial (Wolf *et al.*, 2002b). Se o tratamento não é iniciado em tempo, há risco de danos irreversíveis (como perda auditiva, visual e deficiência intelectual), coma e morte (Wastell *et al.*, 1988; Bay *et al.*, 2010).

As alterações bioquímicas que podem aparecer são acidose cetolática, acidúria orgânica, hiperamonemia, mas nem todos os pacientes apresentam tais alterações. Pode haver excreção elevada de ácido 3-hidroxisovalérico, láctico, 3-hidroxi propiônico e 3-metilcrotonilglicina (análise de ácidos orgânicos em urina), bem como 3-hidroxiisovalerilcarnitina ligeiramente elevada (acilcarnitina plasmática). 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.*, 1983c; Wastell *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 2015; Strovel *et al.*, 2017).

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 tornam-se ou tem o risco de tornarem-se 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). Heterozigotos não desenvolvem sintomas.

6.5 Bases genéticas da deficiência de biotinidase

6.5.1 A estrutura do gene *BTB* e da biotinidase

A figura 4 mostra a estrutura do gene que codifica a biotinidase, chamado *BTB*, do mRNA e da enzima. O gene *BTB* foi inicialmente caracterizado por Cole *et al.* (1994) e Knight *et al.* (1998): localiza-se no cromossomo 3p25, é organizado em quatro éxons e três íntrons, e a sequência entre os nucleotídeos -600 e +400 tem características compatíveis com expressão constitutiva. Os estudos de Stanley *et al.* (2004) indicaram que a porção 5'UTR inicia 90 pares de base antes (à montante), e que o íntron um possui 33,608 pares de base, totalizando um gene com 44k pares de base.

O mRNA apresenta dois códon 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. O peptídeo sinal maior possui motivos consenso que podem direcionar a biotinidase para mitocôndria e retículo endoplasmático, enquanto que o peptídeo sinal menor sinaliza apenas para retículo endoplasmático e melhor coincide com o motivo da maioria dos peptídeos sinal de secreção (Wolf and Jensen, 2005).

Considerando o primeiro códon AUG, a biotinidase é composta por 543 aminoácidos (peptídeo sinal: 41 aminoácidos, proteína madura: 502 aminoácidos). Há seis sítios de N-glicosilação e a enzima glicosilada é estimada em 70.8-79.8 kDa. A estrutura tridimensional da enzima foi predita por modelagem computacional, por homologia com nitrilases/amidases cristalografadas de micro-organismos. De acordo com Pindolia *et al.* (2007), a estrutura da biotinidase é organizada em dois domínios. O domínio amino terminal, Domínio A, possui a tríade catalítica (glutamato 112, lisina 212, e cisteína 245). O Domínio B, homólogo ao domínio de ancoragem da Vanina-1 e domínio Fhit da NitFhit, é possivelmente envolvido com a ligação à biotina. Além disso, há uma região aparentemente flexível que conecta o Domínio A e o Domínio B.

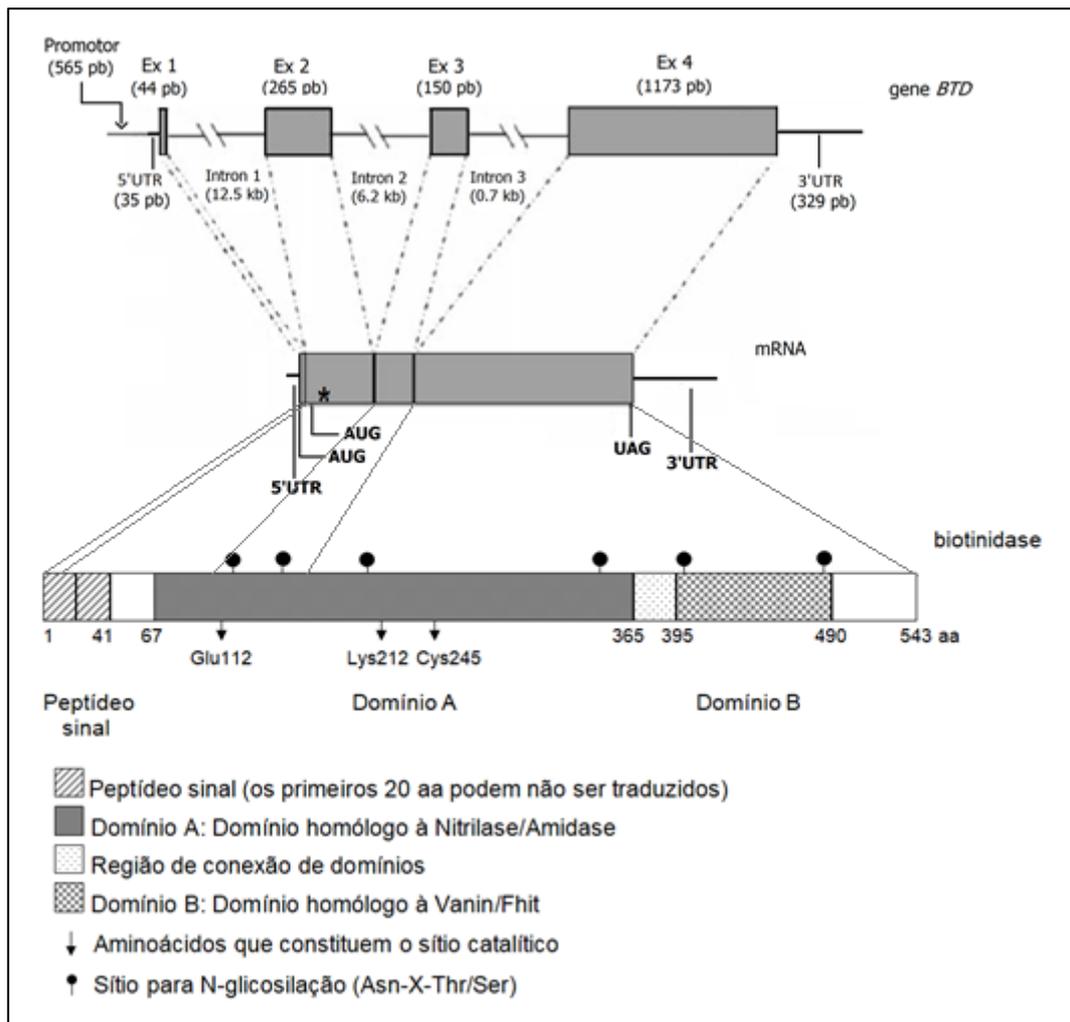


Figura 4. Estrutura do gene *BT D*, mRNA e biotinidase. O gene *BT D* consiste em quatro éxons (Ex) e três íntrons (Int). O mRNA apresenta dois sítios de início de tradução (AUG), um na porção correspondente ao éxon 1 e outro no éxon 2, e um códon de parada no éxon 4 (UAG). O asterisco indica a posição correspondente ao N-terminal da proteína madura. A enzima biotinidase pode ter um peptídeo sinal de 41 ou 21 aminoácidos (aa), se a tradução iniciar no 1º ou 2º AUG, respectivamente. A estrutura tridimensional, predita por homologia, é organizada em dois domínios (A e B). Há seis sítios passíveis de glicosilação. Os esquemas foram baseados nos trabalhos de Pindolia *et al.* (2007, 2010).

6.5.2 Variantes do gene *BT D*

Até o momento, 236 variantes do gene *BT D* foram relatadas em pacientes com DB conforme o banco *Human Gene Mutation Database (HGMD®) Professional 2017.4*. No banco de dados público do *ARUP Laboratories* (Procter *et al.*, 2013), disponível em http://www.arup.utah.edu/database/BTD/BTD_display.php, há 213 variantes reportadas, 6 delas são consideradas de significado incerto (situadas no Domínio A ou regiões fora dos domínios da enzima), 11 são consideradas

benignas (situadas na 5'UTR, peptídeo sinal, Domínios A e B, conexão de domínios) e o restante patogênicas conforme atividade enzimática apresentada pelos pacientes (situadas ao longo de todas as regiões da enzima: peptídeos sinal, Domínios A e B, conexão de domínios, e fora dos domínios). As variantes ocorrem predominantemente nos éxons 2, 3 e 4.

As variantes consideradas benignas são do tipo silenciosa ou localizadas em região não codificante. A variante c.1171C>T (p.Pro391Ser) é uma exceção: ela deve causar substituição de aminoácido mas é considerada benigna com base na atividade da biotinidase sérica apresentada pelos carreadores (Hymes *et al.*, 2001). Tal alteração de aminoácido ocorre na região de conexão de domínios, conforme visto na figura 4.

Dentre as patogênicas, foram descritas variantes de diferentes classes: sentido trocado, sem sentido, pequena deleção ou inserção (um ou mais nucleotídeos), alteração em sítio de *splicing* e mutação alélica composta. As variantes do tipo sentido trocado são predominantes (Pindolia *et al.*, 2010). Em 2016, foi relatada a primeira microdeleção no gene *BTBD* (26kb, que abrange os éxons 2, 3 e 4), encontrada em heterozigose por ocasião de diagnóstico pré-natal por análise de microarranjo para idade materna avançada (Wolf, 2016b).

Estudos que realizaram sequenciamento completo do gene *BTBD* em pacientes com DB não identificaram variantes no éxon 1 (Muhl *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 2002a; Ye *et al.*, 2009; Iqbal *et al.*, 2010). Até que uma deleção de 107kb, incluindo o promotor, éxon 1 e uma porção do íntron 1 do gene *BTBD*, o gene *HACL1* inteiro, e uma porção do gene *COLQ*, foi encontrada em homozigose em paciente sintomático com BD total (Senanayake *et al.*, 2017).

No estudo de Wolf (1991), que incluiu 8.532.617 indivíduos triados para DB em 14 países, a incidência mundial da DB foi estimada em 1:60.089 NV. A partir desse dado, a frequência para alelo da DB foi calculada em 0,004, e a estimativa de heterozigotos para variantes no gene *BTBD* foi de 1 em cada 123 indivíduos.

6.5.3 Genótipo X fenótipo

Pouco se sabe sobre associações entre genótipo e manifestações clínicas na DB. Há um relato de que crianças com variantes nulas (aquelas que provavelmente resultam em ausência da enzima, como mutações sem sentido

e as que causam mudança na fase de leitura) teriam mais chance de desenvolver perda auditiva do que crianças com variantes do tipo sentido trocado (Sivri *et al.*, 2007). Entretanto, certos genótipos estão associados 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 5. 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.Asp444His) apresentam atividade semelhante à de heterozigotos para alelo de deficiência total. Heterozigotos para c.1330G>C (p.Asp444His) apresentam atividade semelhante à de indivíduos homozigotos para o alelo normal.

A figura 5 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, 2016a).

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 (tabela 2). As variantes c.98_104del7ins3 (p.Cys33Phefs*36) e c.1612C>T (p.Arg538Cys) são as mais frequentes nos indivíduos sintomáticos e c.1368A>C (p.Gln456His) e c.[511G>A;1330G>C] (p.[Ala171Tyr;Asp444His]), são as mais comuns entre as crianças triadas (Norgard *et al.*, 1999).

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

Forma da DB	Variante	Localização		Frequência alélica em pacientes sintomáticos	Frequência alélica em pacientes da triagem neonatal
		cDNA	Proteína		
Total ¹	c.98_104del7ins3	Ex2	Peptídeo sinal	35,5%	12,5%
	c.1612C>T	Ex4	c-terminal	22%	3%
	c.1368A>C	Ex4	Domínio B	0%	28%
	c.[511G>A;1330G>C]	Ex4, Ex4	Domínios A e B	0%	17%
Parcial ²	c.1330G>C	Ex4	Domínio B	-	47%

DB = deficiência de biotinidase, Ex = éxon.

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 (tabela 2), demonstrou que quase todos os indivíduos (18/19) têm a variante c.1330G>C (p.Asp444His) em um alelo do gene *BTD* em combinação com uma variante para deficiência total no outro alelo - apenas um indivíduo era heterozigoto composto para duas outras variantes do tipo sentido trocado (Swango *et al.*, 1998). Estimou-se que a variante c.1330G>C (p.Asp444His) causa perda de 52% da atividade da enzima codificada pelo alelo (Norrgard *et al.*, 1998).

Estudos mais recentes identificaram outras variantes que parecem ter efeito mais leve, mas que são bem menos frequentes (foram descritas em casos isolados). São elas: c.143G>A (p.Gly48Glu), c.257T>G (p.Met86Arg), c.310-15delT, c.459+4A>G, c.529G>A (p.Glu177Lys), c.[261C>T;895G>C] (p.[Asn87=;Ala299Pro]), c.968A>G (p.His323Arg) e c.1525C>T (p.Pro509Ser); em heterozigose composta com alelos da deficiência total, também podem estar associadas à DB parcial (Li *et al.*, 2014; Lara *et al.*, 2015; Wiltink *et al.*, 2016).

Espera-se que indivíduos homozigotos para a variante c.1330G>C (p.Asp444His) tenham aproximadamente 45-50% da atividade sérica normal (o que é similar à atividade dos heterozigotos para alelos da deficiência total), e que heterozigotos tenham atividade enzimática muito parecida com a de homozigotos para o alelo normal (figura 5). Tais indivíduos não necessitam de tratamento (McVoy *et al.*, 1990; Swango *et al.*, 1998). A variante c.1330G>C

(p.Asp444His) em combinação com uma variante de deficiência total no mesmo alelo, em configuração *cis*, resulta em um alelo de deficiência total de biotinidase.

A variante c.1330G>C (p.Asp444His) na DB é semelhante à variante Duarte-2 (ou D2) na galactosemia. Heterozigotos compostos para a variante Duarte-2 e uma mutação que causa galactosemia clássica têm em média 25% de atividade normal; esta condição é leve a assintomática (Carney *et al.*, 2009).

Em diversos países, estudos que descrevem as variantes gênicas na DB têm sido realizados, cada qual com as suas particularidades. A tabela 3 compara as frequências das variantes mais frequentes nos dois estudos pioneiros discutidos anteriormente na tabela 2 (Swango *et al.*, 1998; Norrgard *et al.*, 1999) com estudos realizados posteriormente em outros países. Pode-se inferir que a alta frequência da c.1330G>C (p.Asp444His) nos pacientes do Brasil, Holanda e Hungria deve-se à inclusão de pacientes com a forma parcial da deficiência. Na Áustria (Möslinger *et al.*, 2003) esse alelo foi detectado entre pacientes com deficiência total, o que é questionável, uma vez que somente um indivíduo com DB total apresentou tal variante e a atividade enzimática dele é limítrofe entre deficiência total e parcial (9%). Além disso, a alta frequência de casamentos consanguíneos na Arábia Saudita exerce um efeito notório nas frequências alélicas, pois apenas uma das variantes comuns nas outras populações aparece em homozigose em um paciente, e todos os outros indivíduos do estudo são homozigotos para outras variantes (Pomponio *et al.*, 2000b).

É importante conhecer o perfil genético da população-alvo quando se quer aplicar a análise genética para o diagnóstico da DB. De modo geral, as variantes apresentadas na tabela 3 figuram entre as mais frequentes e representam, em conjunto, 55-75% dos alelos (o que não é válido para países com alta taxa de casamentos consanguíneos, e para a amostra do Canadá). Para a apropriada identificação dos dois alelos, para fins de pesquisa e diagnóstico, uma análise ampla é necessária. Usualmente é realizado sequenciamento dos éxons e junções éxon-íntron do gene *BTD* por método de Sanger automatizado.

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

País	Tipo de DB, Diagnóstico (n ^a)	c.98_104del7ins3 (%)	c.1612C>T (%)	c.1368A>C (%)	c.[511G>A;1330G>C] (%)	c.1330G>C (%)	Referência
Brasil	Parcial e total, T e S (n=12)	4,3	8,7	0	4,3	43,5	Borsatto <i>et al.</i> (2014)
Brasil	Parcial e total, T (n=13)	15,4	0	0	11,5	38,5	Neto <i>et al.</i> (2004)
Holanda	Parcial e total, T (n=40)	1,2	2,5	21,2	10	38,7	Wiltink <i>et al.</i> (2016)
Hungria	Parcial e total, T (n=57)	7,5	5	14	10	40	Milánkovics <i>et al.</i> (2010)
EUA e outros	Parcial, T (n=19)	8	5	13	10,5	47	Swango <i>et al.</i> (1998)
EUA	Total, T (n=59)	12,5	3	28	17	0	Norrgard <i>et al.</i> (1999)
	Total, S (n=33)	34,5	22	0	0	0	
Canadá	Total, T (n=9)	16,7	0	11	0	0	Gannavarapu <i>et al.</i> (2015)
Itália	Total, T (=10)	0	0	40	15	0	Porta <i>et al.</i> (2017)
Hungria	Total, *	12,5	8	23,5	17	0	Milánkovics <i>et al.</i> (2010)
Áustria, Turquia, Iugoslávia	Total, T (n=15)	23	0	26,6	3	3	Möslinger <i>et al.</i> (2003)
Turquia	Total, T (n=15)	9	0	13,6	13,6	0	Pomponio <i>et al.</i> (2000a)
	Total, S (n=13)	37,5	6	12,5	0	0	
Arábia Saudita	Total, S (n=08)	12,5	0	0	0	0	Pomponio <i>et al.</i> (2000b)

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

^a n = tamanho amostral. O n apresentado aqui não é o n total do estudo; foram incluídos apenas os casos índice e que tiveram DB confirmada por atividade da biotinidase sérica (DB total: <10%, DB parcial: 10-30%) e posterior análise genética.

* Dado não relatado.

6.6 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. 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.

6.6.1 Triagem neonatal

Na década de 80, Wolf *et al.* (1983a) desenvolveram um método para determinação da atividade da biotinidase sérica e demonstraram que indivíduos com deficiência múltipla de carboxilases de início tardio apresentavam atividade reduzida da biotinidase, 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, programas espalhados pelo mundo (14 países) já haviam incluído a triagem para DB (Wolf, 1991). Alguns mantiveram e outros não (por questões econômicas e baixa incidência), e com o passar dos anos outros países também foram incluindo triagem para DB.

Atualmente, a DB está incorporada em programas de triagem neonatal da América do Norte, vários países da América do Sul, alguns programas europeus, e Irã e Emirados Árabes no Oriente Médio (Therrell *et al.*, 2015; Al-Jasmi *et al.*, 2015; Asgari *et al.*, 2016). Grupos de pesquisa dos EUA, Canadá, Holanda, Itália, Hungria, Grécia, Turquia e Emirados Árabes Unidos têm publicado dados sobre a triagem para DB, inclusive dados de análise genética (Milánkovics *et al.*, 2010; Thodi *et al.*, 2013, 2016; Karaca *et al.*, 2015; Al-Jasmi *et al.*, 2015; Gannavarapu *et al.*, 2015; Wiltink *et al.*, 2016; Porta *et al.*, 2017).

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).

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. O Colégio Americano de Genética Médica e Genômica publicou em 2017 uma atualização das diretrizes para o diagnóstico laboratorial da DB. Crianças que têm o resultado da triagem alterado devem 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. A enzima apresenta labilidade, portanto as amostras de plasma ou soro devem ser congeladas e enviadas ao laboratório em gelo seco (Strovel *et al.*, 2017).

O método mais difundido para medida quantitativa da atividade da biotinidase (atividade biotínil-hidrolase) é a determinação colorimétrica da liberação de ácido 4-aminobenzóico (também conhecido como ácido *para*-aminobenzóico ou PABA) do ácido biotínil-4-aminobenzóico, um substrato análogo da biocitina. Resumidamente, a amostra de soro é incubada com o substrato artificial ácido biotínil-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 por

espectrofotometria 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 soro, e pode ser convertido em porcentagem em relação ao valor considerado normal (média da atividade em indivíduos normais). O princípio do método de triagem é o mesmo, porém qualitativo: 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 6 mostra a etapa final do ensaio quantitativo da biotinidase realizado no Laboratório de Referência para Erros Inatos do Metabolismo do HCPA, como exemplo. Observam-se amostras com diferentes intensidades de cor, o que significa que possuem diferentes níveis de atividade da biotinidase.

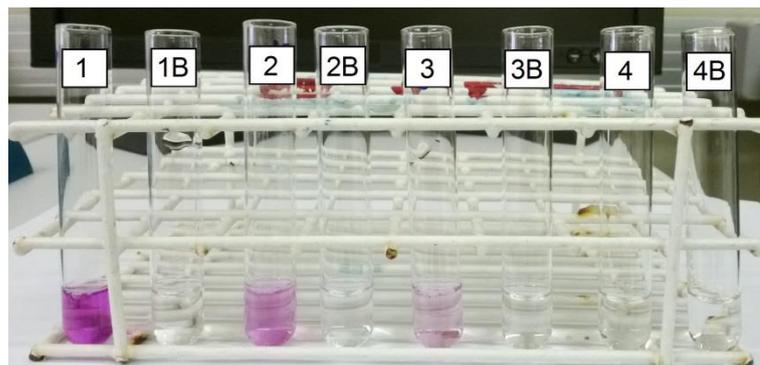


Figura 6. Ensaio quantitativo da atividade da biotinidase. A amostra é soro, e o substrato é o ácido biotinil-4-aminobenzóico. Ao lado direito das amostras, tubos 1-4, estão os respectivos brancos (1B-4B). De acordo com a absorbância a 546 nm, as amostras 1, 2, 3 e 4 possuem atividade da biotinidase 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 biotinil-6-aminoquinolina (Wastell *et al.*, 1984), biocitina (Kumasaka *et al.*, 2001), e análogos biotinilados radioisotópicos (Livaniou *et al.*, 1997), mas são mais caros, de difícil execução, e não são facilmente adaptáveis às amostras de sangue em papel-filtro (Strovel *et al.*, 2017).

6.6.2 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).

6.6.3 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 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).

6.6.4 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.

6.6.5 Fatores responsáveis por falsos-positivos e falsos-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 falsos-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 e pós-gestacional. Em 64 recém-nascidos (prematuros: 16 e a termo: 48), a atividade da biotinidase teve correlação positiva com idade gestacional. Além disso, entre o primeiro e o terceiro dia de vida, as atividades estavam abaixo do considerado normal para adultos em todos os recém-nascidos avaliados. Em 56/64 recém-nascidos, 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 8/64 recém-nascidos (todos os oito pertencentes ao grupo de prematuros) a atividade da biotinidase reduziu entre o 3^o-7^o dias de vida (eles apresentaram atividade entre 4,7-26,0% neste período), e atingiu o nível normal de adultos entre o 20^o-40^o dias de vida. O período coincide com a coleta da amostra para triagem neonatal e, portanto, eles teriam testes com resultados falsos-positivos. 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. (Suormala *et al.*, 1988).

Com o objetivo de esclarecer a questão dos falsos-positivos na triagem neonatal para DB, Schulpis *et al.* (2003) avaliaram a atividade da biotinidase no soro de recém-nascidos a termo, prematuros e pequenos para a idade gestacional (PIG) com icterícia e controles (bilirrubina total entre 1,0-4,0 mg/dL). No grupo de controles, a atividade da biotinidase nos prematuros ($3,3 \pm 1,2$ nmol/min/mL) e PIG ($3,3 \pm 0,8$ nmol/min/mL) foi menor do que a atividade nos nascidos a termo ($5,0 \pm 1,1$ 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 de 50% na 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 ictericos 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 biotínil-6-aminoquinolina, resultados falsos-positivos podem ocorrer se o indivíduo tem uma concentração elevada de triglicerídeos. Níveis de albumina acima do normal, o uso de certos antibióticos e ácido valpróico podem interferir no teste causando resultados falsos-negativos (bula Neonatal biotinidase kit, PerkinElmer®, Wallac Oy, Turku, Finland, 2011). A presença de interferentes que causam resultados falsos-negativos deve ser testada executando um ensaio livre de substrato para cada amostra de paciente (se não houver interferente, não desenvolverá cor/fluorescência) (Strovel *et al.*, 2017).

6.6.6 Exame complementar

Os ácidos orgânicos na urina (análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massa) e acilcarnitinas em plasma ou urina (análise por cromatografia líquida/espectrometria de massa em tandem) podem estar alterados 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, 3-hidroxi-isovalerato, 3-metilcrotonilglicina e 3-hidroxi-isovalerilcarnitina que ocorre na DB também ocorre em outras condições ou doenças. Portanto, essas abordagens não são apropriadas como o único teste em indivíduos suspeitos de DB, são apenas complementares ao teste da atividade da biotinidase (Wolf *et al.*, 1983c; Baumgartner and Suormala, 2012).

6.6.7 Análise genética

A confirmação da DB por análise do DNA (extraído de sangue total, fibroblastos, ou de sangue coletado em papel-filtro), pode ser útil em alguns casos. A análise genética auxilia na diferenciação de indivíduos com DB total e DB parcial, assim como indivíduos com DB parcial dos que são heterozigotos para alelo de deficiência total ou dos homozigotos para o alelo c.1330G>C (p.Asp444His). Esta abordagem é particularmente importante quando há variabilidade na atividade enzimática entre diferentes amostras (testes

consecutivos) ou laboratórios, ou discrepância entre paciente e controle parental (Strovel *et al.*, 2017).

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. A pesquisa direcionada de variantes mais frequentes é mais barata do que o sequenciamento completo do gene, mas não é capaz de detectar variantes menos comuns e, portanto, pode não ser suficiente para identificar os dois alelos (Wolf, 2012). Há duas deleções grandes descritas no gene *BTD* (uma de 26kb e outra de 107kb) e os autores sugerem considerar uma análise de microarranjo ou outra metodologia para deleção quando a atividade enzimática é menor do que a atribuída ao genótipo encontrado por sequenciamento (Wolf, 2016b; Senanayake *et al.*, 2017).

6.7 Tratamento

Os indivíduos com DB total, sintomáticos ou assintomáticos (identificados por triagem neonatal), 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 especialistas recomendam o tratamento com biotina, entre 1-5mg/dia, nesse caso (McVoy *et al.*, 1990; Wolf, 2010).

Uma vez que o tratamento consiste em suplementação com biotina na forma livre, a quantidade de enzima biotinidase e a atividade não são alteradas. 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).

As seguintes avaliações são recomendadas para indivíduos identificados com DB: exame físico para hipotonia, ataxia, rash cutâneo, alopecia, conjuntivite, problemas respiratórios, avaliação auditiva e oftalmológica, e para déficit psicomotor e/ou do desenvolvimento. Para a monitorização, as recomendações incluem: avaliações auditiva e oftalmológica, avaliações com geneticista ou especialista do metabolismo, além de acompanhamento com especialista para problemas residuais (sequelas), anualmente (ou bianualmente no caso da DB parcial) (Wolf, 2012).

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 (Wastell *et al.*, 1988; Szymanska *et al.*, 2015). Além disso, indivíduos com DB identificados por triagem neonatal, e tratados desde então, têm os sintomas prevenidos. Resumidamente, os seguintes desfechos foram descritos em 44 jovens e adultos com DB total diagnosticados por triagem e sob tratamento (16-32 anos de idade): todos completaram com sucesso o ensino médio, muitos estavam cursando ou já tinham completado faculdade ou pós-graduação; cinco mulheres tiveram nove gravidezes e partos sem intercorrências; alguns casos de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, ansiedade, depressão leve, rashes, eczema e perda auditiva unilateral; e poucos casos de convulsão (episódios restritos) e zumbido (Wolf, 2016c). Outro estudo avaliou os desfechos de 120 pacientes com DB parcial (2 semanas-29 anos): havendo boa adesão, estes pacientes parecem ter desenvolvimento físico e cognitivo normal. Apesar de algumas crianças terem apresentado problemas clínicos (diversos tipos de problemas cutâneos, perda auditiva, casos isolados de atraso na fala, autismo, dislexia, déficit cognitivo leve, baixo desempenho escolar, por exemplo) é improvável que sejam atribuíveis à DB – essas condições ocorrem em pequeno número na população em geral (Jay *et al.*, 2015).

6.8 Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para DB no Brasil

Em julho de 2017, foi aprovado e publicado pelo Ministério da Saúde o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Deficiência de Biotinidase (elaborado pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde, CONITEC). O documento fornece orientações para o

diagnóstico por triagem neonatal, tratamento e acompanhamento dos pacientes (aconselhamento genético, avaliações oftalmológicas, auditivas, etc.). De modo geral, segue as orientações da literatura internacional.

Pacientes com resultados da triagem neonatal alterados serão classificados como suspeitos e deverão entrar em tratamento até a confirmação ou não do diagnóstico, o qual será estabelecido a partir da determinação quantitativa da atividade sérica de biotinidase. Com base no nível da atividade de biotinidase, os pacientes são classificados em três grupos principais: atividade normal - mais de 30% da média da atividade sérica normal de biotinidase (em relação ao controle do padrão laboratorial); DB leve – 10% a 30%; DB grave – menos de 10%. São incluídos no protocolo todos os pacientes com atividade inferior a 30% da atividade normal, isto é, DB leve ou grave. No documento, consta ainda que a análise genética fica restrita a casos especiais, quando há necessidade de elucidação diagnóstica em resultados enzimáticos contraditórios ou diagnósticos pré-natais, por exemplo (CONITEC, 2017).

É de nosso conhecimento que, no sistema privado, os pacientes são encaminhados para o teste quantitativo logo após teste de triagem neonatal alterado para confirmação e, posteriormente, é realizada a instituição da terapia com biotina se necessário (conforme o resultado).

7 HIPÓTESE

A hipótese avaliada no primeiro capítulo desta tese é que parte dos indivíduos com atividade reduzida da biotinidase tem fenótipo bioquímico (DB total, DB parcial, heterozigoto) discordante do seu genótipo. Além disto, variantes genéticas (em regiões comumente não avaliadas) e fatores não genéticos, tais como transporte da amostra, prematuridade e icterícia, poderiam explicar os casos de discordância entre genótipo e fenótipo bioquímico.

No segundo capítulo, avaliamos se variante associada a DB parcial (c.1330G>C ou p.Asp444His) e as variante novas identificadas em pacientes brasileiros (c.119T>C ou p.Leu40Pro, c.479G>A ou p.Cys160Tyr, c.664G>A ou p.Asp222Asn, c.1337T>C ou p.Leu446Pro, c.1466A>G ou p.Asn489Ser) têm efeitos deletérios sobre a enzima biotinidase que expliquem a atividade enzimática reduzida nos pacientes.

Por fim, a hipótese avaliada no terceiro capítulo é que pacientes com atividade da biotinidase em níveis de DB parcial poderiam ter alterações metabólicas subclínicas.

8 JUSTIFICATIVA

O tratamento da DB é simples e eficaz quando instituído precocemente, entretanto o diagnóstico da condição é um processo com obstáculos, por exemplo, testes confirmatórios (atividade enzimática) com resultados consecutivos discordantes, e identificação de variantes novas (ou seja, sem significado conhecido) durante análise genética. Com a ampliação do PNTN em 2012 (conhecido como teste do pezinho, e oferecido de forma universal), mais recém-nascidos estão tendo a oportunidade de serem triados para DB, o que possivelmente está acarretando aumento do número de testes confirmatórios com resultados inconclusivos: atividade em tronco de 30%, ou medidas consecutivas discordantes. A incerteza do diagnóstico (classificação entre DB total, DB parcial, heterozigoto ou normal) gera estresse nos familiares em relação ao prognóstico do probando e também em relação ao planejamento familiar (risco de recorrência). Além disto, há pouco conhecimento sobre a história natural da DB parcial e sobre a necessidade de tratamento preventivo. Esses problemas foram o que motivaram e o que justificam a realização desta tese.

8.1 Estudo da associação entre genótipo e fenótipo bioquímico com ampliação da análise do gene *BTD* e avaliação de fatores não genéticos

Em estudo realizado por um serviço privado de Porto Alegre, que incluiu 21 pacientes identificados por triagem bioquímica para DB, a análise genética foi incompatível com o diagnóstico de DB de oito crianças (cujos testes enzimáticos quantitativos variavam entre a normalidade e a DB), pois eram heterozigotas para a doença ou não apresentavam alteração genética (Neto et al., 2004). Em estudo prévio do nosso grupo, com 38 indivíduos com atividade reduzida da biotinidase, foi verificada discordância entre o fenótipo bioquímico e o genótipo em alguns pacientes. Três pacientes apresentaram atividade enzimática sutilmente maior (heterozigose) do que a esperada pelo genótipo (DB parcial), e quatro pacientes apresentaram atividade enzimática menor (compatível com heterozigose) do que a esperada pelo genótipo (atividade normal) (Borsatto et al., 2014). No ano seguinte, o centro de referência para triagem neonatal de Minas Gerais publicou um estudo e, entre os oito pacientes que tiveram análise genética, um paciente com atividade enzimática

correspondente a DB parcial foi identificado como heterozigoto para a variante 1330G>C (p.Asp444His) (Lara et al., 2015).

Tanto o teste de triagem neonatal para DB, realizado em sangue impregnado em papel-filtro, como o teste confirmatório, que é a medida quantitativa da atividade da biotinidase no plasma ou soro, podem sofrer interferências que levam a resultados falsos-positivos ou falsos-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.

Acredita-se que a principal causa para os falsos-positivos e divergência nas repetições do teste enzimático é o transporte e/ou estocagem inadequados das amostras. A recomendação é que as amostras sejam mantidas congeladas para que não ocorra diminuição da atividade enzimática, já que a biotinidase é lábil. 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. Se as amostras dos pais e controle não relacionado não 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. Além disso, recém-nascidos prematuros e a termo só atingem os valores de referência definidos para adultos após um mês, aproximadamente. (Suormala *et al.*, 1988). Outro estudo mostrou que em torno de 50% dos testes de triagem falsos-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 foi encontrada atividade reduzida da biotinidase. 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. Recomenda-se 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).

É possível que discordâncias entre genótipo e fenótipo bioquímico sejam explicadas por interferências ambientais sobre a amostra de plasma, por condições como prematuridade/idade e icterícia, como relatado anteriormente, ou por fatores genéticos ainda desconhecidos. É possível que existam variações na sequência da região promotora, 5'UTR e éxon 1 - regiões não analisadas nos estudos brasileiros previamente publicados - que influenciam a expressão do gene *BTD* e/ou atividade da enzima biotinidase.

8.2 Estudo funcional de variantes gênicas

No estudo prévio do nosso grupo sobre DB (n= 38), constatamos que a variante do gene *BTD* mais frequente entre pacientes brasileiros é a c.1330G>C (p.Asp444His), cuja frequência alélica foi de 50% na amostra. Essa variante também é frequente na população saudável do sul do Brasil (n= 100; frequência alélica= 4%) (Borsatto *et al.*, 2014) e na coorte de idosos da cidade de São Paulo do Arquivo Brasileiro Online de Mutações (n= 609; frequência alélica= 2,7%) (Naslavsky *et al.*, 2017).

Por comparação entre a média da atividade da biotinidase de heterozigotos para a variante c.1330G>C (p.Asp444His) (5,25 nmol/min/mL) e a média da atividade normal (7,1 nmol/min/mL), foi calculado que a variante causa perda de 52% da atividade na enzima aberrante (Norrgard *et al.*, 1998). Não foram encontrados estudos publicados que avaliam a expressão *in vitro* de tal variante de forma a confirmar sua patogenicidade.

Além disso, identificamos seis variantes novas do gene *BTD* em pacientes brasileiros: três variantes em estudo prévio (Borsatto *et al.*, 2014), e outras três no estudo do capítulo 1 desta tese (Borsatto *et al.*, 2017). Cinco variantes novas são do tipo sentido trocado (c.119T>C ou p.Leu40Pro, c.479G>A ou p.Cys160Tyr, c.664G>A ou p.Asp222Asn, c.1337T>C ou p.Leu446Pro, c.1466A>G ou p.Asn489Ser), as quais foram preditas como patogênicas por ao menos um recurso de bioinformática e não foram detectadas em controles, e uma variante cria um códon de parada prematuro (c.962G>A ou p.Trp321*) e, portanto, provavelmente é patogênica.

Para esclarecermos o quanto a variante comum c.1330G>C (p.Asp444His) e as variante novas contribuem para o fenótipo bioquímico, e

consequentemente qual sua importância clínica, é necessária uma avaliação funcional das mutações, através da análise dos produtos de expressão de tais variantes.

8.3 Avaliação bioquímica da DB parcial

Após a descrição da DB na década de 80, em indivíduos sintomáticos com atividade da biotinidase praticamente nula, testes de triagem neonatal começaram a ser executados ao redor do mundo e indivíduos com deficiências menos graves (DB parcial) começaram a ser identificados. Além de pacientes com DB total, muitas vezes aqueles com DB parcial são tratados de modo preventivo. Por isso, há pouca informação sobre a história natural da DB parcial.

Um dos tipos de modelo animal para DB é a submissão de ratos à dieta deficiente em biotina, os quais são geralmente utilizados quando apresentam sinais da deficiência em pleno desenvolvimento (6-8 semanas). Nesse momento eles também estão gravemente desnutridos. Portanto, não é possível diferenciar quais efeitos são específicos da deficiência de biotina. Em estudo que visava caracterizar esse modelo para aprimorar a sua utilização, foram verificados efeitos precoces (2ª semana) de déficit de energia celular (aumento da razão AMP/ATP), ativação do sensor de energia AMPK, alterações na transcrição de genes do metabolismo do carbono e glicemia pós-prandial reduzida. Em seguida (4ª semana), mas ainda antes dos sinais de DB, foi constatado aumento na concentração sérica de lactato e ácidos graxos livres, e diminuição de triglicérides, colesterol total e glicogênio hepático (Hernandez-Vazquez *et al.*, 2012).

A importância da triagem e tratamento preventivo da DB parcial é ainda é muito discutida. Além disso, existe dificuldade na classificação fenotípica dos pacientes com atividade reduzida da biotinidase. Nesse contexto, e em vista dos achados em modelo animal, é interessante avaliar pacientes com atividade reduzida da biotinidase em período assintomático e pré-tratamento, quanto a alterações metabólicas subclínicas na busca de biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico e prognóstico da forma parcial de DB.

9 OBJETIVOS

9.1 Objetivo geral

Estudar a associação entre genótipo e fenótipo na DB.

9.2 Objetivos específicos

I. Identificar as variantes mais frequentes do gene *BTD* em pacientes brasileiros.

II. Verificar a associação entre genótipo e fenótipo bioquímico (classe de atividade da biotinidase) em pacientes brasileiros.

III. Examinar a região promotora, 5'UTR e éxon 1 e do gene *BTD* (regiões comumente não avaliadas) para identificação de variantes que possam estar contribuindo para os níveis de atividade da biotinidase nos pacientes.

IV. Avaliar fatores não genéticos que possam contribuir para o fenótipo bioquímico, como prematuridade, icterícia e transporte da amostra.

V. Avaliar a atividade enzimática em função da idade.

VI. Estabelecer critérios para o emprego da análise genética no contexto do diagnóstico da DB.

VII. Avaliar a patogenicidade da variante mais frequente (c.1330G>C ou p.Asp444His) e das variantes novas do tipo sentido trocado (c.119T>C ou p.Leu40Pro, c.479G>A ou p.Cys160Tyr, c.664G>A ou p.Asp222Asn, c.1337T>C ou p.Leu446Pro, c.1466A>G ou p.Asn489Ser), identificadas em pacientes brasileiros, por meio de expressão *in vitro*.

VIII. Realizar avaliação metabólica em indivíduos com DB parcial - através da medida de ácidos graxos, aminoácidos, colesterol total, triglicerídeos, glicose e insulina em amostras de plasma - na busca de biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico e prognóstico (evidências de patogenicidade da DB parcial).

10 CAPÍTULO 1: Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients

O capítulo 1 desta tese consiste na averiguação dos genótipos e fenótipos bioquímicos (classe de atividade da biotinidase) apresentados por indivíduos brasileiros com atividade reduzida da biotinidase. Em relação ao trabalho anterior do grupo sobre DB, houve ampliação da amostra de pacientes, extensão da análise do gene *BTD*, e avaliação de fatores não genéticos. O capítulo será apresentado na forma do artigo publicado na revista PLOS ONE em maio de 2017.

RESEARCH ARTICLE

Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients

Taciane Borsatto^{1,2*}, Fernanda Sperb-Ludwig^{1,2}, Samyra E. Lima^{2,3}, Maria R. S. Carvalho⁴, Pablo A. S. Fonseca⁴, José S. Camelo, Jr⁵, Erlane M. Ribeiro⁶, Paula F. V. de Medeiros⁷, Charles M. Lourenço⁵, Carolina F. M. de Souza⁸, Raquel Boy⁹, Têmis M. Félix⁸, Camila M. Bittar^{1,8}, Louise L. C. Pinto¹⁰, Eurico C. Neto¹¹, Henk J. Blom¹², Ida V. D. Schwartz^{1,2,8}

1 Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil, **2** BRAIN Laboratory, Center for Experimental Research (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil, **3** Centro Universitário Ritter dos Reis, Porto Alegre, RS, Brazil, **4** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, **5** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, **6** Hospital Infantil Albert Sabin, Fortaleza, CE, Brazil, **7** Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brazil, **8** Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil, **9** Departamento de Pediatria, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **10** Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, SC, Brazil, **11** CTN Diagnósticos, Porto Alegre, RS, Brazil, **12** Laboratory of Clinical Biochemistry and Metabolism, Department of General Pediatrics, Adolescent Medicine and Neonatology, University Medical Centre Freiburg, Freiburg, Germany

* taciborsatto@hotmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Lima SE, S. Carvalho MR, S. Fonseca PA, S. Camelo J, Jr, et al. (2017) Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. PLoS ONE 12(5): e0177503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177503>

Editor: Anna Carla Goldberg, Hospital Israelita Albert Einstein, BRAZIL

Received: November 17, 2016

Accepted: April 30, 2017

Published: May 12, 2017

Copyright: © 2017 Borsatto et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study received financial support from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) for research materials and publication fee. Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) funded the translation. ECN has a commercial affiliation (CTN Diagnósticos) which did not have

Abstract

Introduction

The association between the *BTD* genotype and biochemical phenotype [profound biotinidase deficiency (BD), partial BD or heterozygous activity] is not always consistent. This study aimed to investigate the genotype-biochemical phenotype association in patients with low biotinidase activity.

Methods

All exons, the 5'UTR and the promoter of the *BTD* gene were sequenced in 72 Brazilian individuals who exhibited low biotinidase activity. For each patient, the expected biochemical phenotype based on the known genotype was compared with the observed biochemical phenotype. Additional non-genetic factors that could affect the biotinidase activity were also analysed.

Results

Most individuals were identified by neonatal screening (n = 66/72). When consecutive results for the same patient were compared, age, prematurity and neonatal jaundice appeared to affect the level of biotinidase activity. The biochemical phenotype at the time of the second blood collection changed in 11/22 patients compared to results from the first sample. Three novel variants were found: c.1337T>C (p.L446P), c.1466A>G (p.N489S) and c.962G>A (p.W321*). Some patients with the same genotype presented different

any role or financial contribution to this research. TB have fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). FS had fellowship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). IVDS, MRSC and PASF have fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). HB receives a research grant of Orphan Europe. The funders did not provide support in the form of salaries for any author, and did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Competing interests: Eurico C. Neto is employed by CTN Diagnósticos. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter our adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

Abbreviations: UTR, untranslated region; BD, biotinidase deficiency; ChIP-Seq, chromatin immunoprecipitation sequencing; Sp1, Sp1 transcription factor; NF-1, neurofibromin 1; C/EBPalpha, CCAAT/enhancer binding protein alpha; C/EBPdelta, CCAAT/enhancer binding protein delta.

biochemical phenotypes. The expected and observed biochemical phenotypes agreed in 68.5% of cases (concordant patients). The non-coding variants c.-183G>A, c.-315A>G and c.-514C>T were present in heterozygosity in 5/17 discordant patients. In addition, c.-183G>A and c.-514C>T were also present in 10/37 concordant patients.

Conclusions

The variants found in the promoter region do not appear to have a strong impact on biotinidase activity. Since there is a disparity between the *BTD* genotype and biochemical phenotype, and biotinidase activity may be affected by both genetic and non-genetic factors, we suggest that the diagnosis of BD should be based on more than one measurement of plasma biotinidase activity. DNA analysis can be of additional relevance to differentiate between partial BD and heterozygosity.

Introduction

Biotinidase (EC 3.5.1.12) plays a critical role in the absorption of biotin from dietary sources and in biotin recycling. In biotinidase deficiency (BD, OMIM: 253260), an autosomal recessive disease caused by pathogenic mutations in the *BTD* gene, both deficiencies of biotin and in biotin-dependent carboxylases occur [1, 2]. Treatment with oral administration of free biotin can prevent the symptoms (cutaneous rash, seizures, motor, hearing and vision problems, developmental delay, coma, and death) and should ideally be started during the neonatal period [3].

The measurement of biotinidase activity in plasma or serum by colorimetric assay [2] is the most frequently used method for the diagnosis of BD. Unfortunately, a number of issues can influence the measurement of biotinidase activity, including the temperature of the sample during storage or transport, the presence of jaundice, prematurity and even postnatal age [4–6], resulting in erroneously lower readings. Sequencing of the *BTD* gene is an additional method used to establish the correct diagnosis and make decisions about life-long treatment, e.g., patients with profound or partial BD should receive daily oral biotin supplementation. A substantial number of severe mutations in homozygosity or compound heterozygosity are associated with profound BD (biotinidase activity <10% of average normal activity). Compound heterozygosity between c.1330G>C (p.D444H) and a severe mutation is associated with partial BD (activity within 10–30%). Individuals who are homozygous for p.D444H show plasma biotinidase activity similar to the heterozygous for a severe mutation [7]. Compound heterozygosity between one severe mutation and one of the next four less frequent mutations [c.968A>G (p.H323R), c.257T>G (p.M86R), c.310-15delT [8] and c.529G>A (p.E177K)] is likely to cause partial BD [9]. However, the association between the *BTD* genotype and biotinidase activity is not always consistent [10–13]. This disagreement may be due to the aforementioned factors that affect biotinidase activity or unknown factors, such as genetic variants in non-coding regions of the *BTD* gene.

In 2014, we published a study on the genetic evaluation of 38 Brazilian patients with low biotinidase activity [12]. The current manuscript represents an extension of that study and presents data for 34 additional patients, including analysis of the promoter region, 5'UTR and exon 1 of the *BTD* gene for all 72 patients. In addition, we investigated the relationship between genotype and biochemical phenotype.

Methods

This is a multicentre, observational, cross-sectional study with a convenience sampling strategy that was approved by the Ethics in Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. All patients and/or their legal guardians provided written informed consent.

In Brazil, neonatal screening for BD is available in private and public health systems. The public system has wide coverage, reaching more than 84% of Brazilian live births in 2014 [14]. According to the National protocol, blood must be collected on filter paper between the 3rd and 5th days of life. If the result is abnormal, a second collection and test on filter paper must be performed. If the second result is also decreased, biotin treatment should be initiated and, after 3 months, an additional confirmatory test should be performed. The confirmatory test is the quantitative measurement of biotinidase activity in plasma. If the result is profound or partial BD (activity below 30%), treatment and medical follow-up should be maintained. If the result is higher than 30%, treatment is stopped. Tests are performed in reference laboratories [15].

Subjects

The total sample comprised 72 individuals (40 males), including one pair of siblings, aged one month to 18 years, who were recruited from 2012 to 2015 by contacting Brazilian medical geneticists through the mailing list of the Brazilian Medical Genetics Society. The inclusion criterion was reduced biotinidase activity (a value below the normal reference range for the testing laboratory, i.e., heterozygous level, partial or profound BD) detected by quantitative testing after abnormal neonatal screening ($n = 59$ patients) or after clinical suspicion ($n = 6$ patients). In addition to these participants, seven subjects (identified by neonatal screening) who had no quantitative test were also included in the study because the special interest of the families and geneticists in the molecular analysis, once they did not have access to the confirmatory test.

Clinical information and blood samples were collected from patients and their parents (samples from both parents were available for 55 patients, samples from only one parent were available for nine patients, and no parental samples were available for eight patients). The patients came from several regions of Brazil (South = 42, Southeast = 15, Northeast = 15).

Biotinidase activity

Quantitative enzyme activity testing results were available for 65/72 patients. All laboratories ($n = 11$) that performed the tests used the colorimetric testing in plasma or serum described by Wolf et al. [2], and the normal reference range of 5.0–10 nmol/min/mL was applied. The mean value of 7.5 nmol/min/mL was used to classify the biochemical phenotype among patients who presented activity lower than 5.0 nmol/min/mL: <0.75 ($<10\%$), profound BD; 0.75–2.25 (10–30%), partial BD; and 2.26–4.99 (30.1–66.5%), heterozygous activity. Patients whose biotinidase activity was 5.0–10.0 nmol/min/mL were considered to have 100% activity. Values within ± 0.1 of a cut-off point were classified as borderline. When more than one measurement was available, the highest value was used for classification purposes. For the remaining patients ($n = 7/72$), only qualitative enzyme activity testing results were available; thus, these patients were not included in the biochemical phenotyping.

DNA analysis

In our previous study, the DNA of 38 patients was extracted from blood samples in EDTA, and exons 2, 3, and 4, as well as the exon/intron junctions of the *BTD* gene, were sequenced [12]. In the present study, the same analysis was performed for the additional 34 participants.

Furthermore, the promoter region, 5'UTR and exon 1 (according to annotation at GenBank, accession no. AF018630.1) were analysed for all 72 samples. A fragment of 715 base pairs (bp) including the *BTD* promoter, 5'UTR, and exon 1 was amplified by PCR using the primers 5' – CCCACCATATCGCCACATCC–3' and 3' – CCGCACGCCCTTACCACA–5' and an annealing temperature of 67°C, followed by Sanger sequencing. This strategy allowed for analysis of the 599 bp upstream of the first translation start site. Parental samples were assessed to define whether the identified variants were in *cis* or *trans*. The sequence NG_008019.1 was used as the reference sequence for the *BTD* gene.

Since the sample included one pair of siblings and five children of consanguineous parents, the total number of alleles was 137.

The establishment of the expected biochemical phenotype to each genotype found was based on the literature [7]. As a result, we could only include genotypes composed of variants with known clinical significance (reported at ARUP database, http://utahedu.aruplab.com/database/BTD/BTD_welcome.php). Non-coding variants were not considered in this classification.

A portion of exon 4 of the *BTD* gene (exon 4d) was sequenced in anonymous samples from 100 healthy, adult controls from Southern Brazil as part of our previous study [12]. Those results were reassessed to verify the frequencies of the missense variants described for the first time in the present study, c.1337T>C or p.L446P and c.1466A>G or p.N489S.

The frequency of the p.D444H allele and the frequency of patients classified as partial BD based on enzyme activity and genotype were compared between South, Southeast and Northeast Brazil using the Chi-square test. The significance level of 5% was adopted and IBM SPSS Statistics for Windows version 23.0 software (Armonk, NY: IBM Corp) was used.

Comparison between genotype and biochemical phenotype

For each genotype observed, the biochemical phenotype (profound BD, partial BD, heterozygous activity, normal activity) presented by the patients was verified. Furthermore, the expected biochemical phenotype (based on the genotype) and the observed biochemical phenotype were compared in patients for whom both classifications were available, and these comparative results were classified as being either concordant or discordant. When the biotinidase activity was borderline between two categories (e.g., between profound and partial BD), the expected biochemical phenotype was considered concordant if one of the two categories was consistent with the expected biochemical phenotype.

Bioinformatics analysis

The pathogenicity of the novel variants p.L446P and p.N489S was evaluated using PolyPhen-2 [16], SIFT [17] and Mutation Taster [18] software.

Conservation in the region surrounding the non-coding variants in the *BTD* promoter (chr3:15637844–15648175 according to GRCh37/hg19) was evaluated using ECR Browser [19] (<http://ecrbrowser.dcode.org/>). Evolutionary conservation of the nucleotides at the non-coding variant positions was then assessed using the multiple alignment tool MAFFT version 7 [20] (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). The Alibaba version 2.1 tool was used to predict transcription factor binding sites that could be created or abolished by the non-coding variants (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>). The Gene Cards database [21] (www.genecards.org) was consulted to compare the expression profiles (mRNA and protein) of biotinidase and transcription factors that had binding sites predicted to be created/abolished in the *BTD* gene. This comparison focused on liver and pancreas expression patterns, where serum and intestinal biotinidase is produced. Finally, the ENCODE ChIP-Seq Significance Tool [22]

(<http://encodeqt.simple-encode.org/>) was used to verify whether the predicted binding sites for transcription factors were corroborated by the ChIP-Seq experiments.

Results

Clinical data and biochemical classification

Sixty-six patients were identified by neonatal screening, 55 of whom were receiving biotin supplementation at inclusion; none had clinical manifestations suggestive of BD. Six patients were preterm (35–36 weeks of pregnancy), and neonatal jaundice was reported for another six patients.

Six patients were diagnosed based on clinical suspicion. In these patients, the most common symptoms were visual disturbances, neurological manifestations, and skin lesions. The age at onset of clinical manifestations ranged from one day to 10 years, and the age at diagnosis ranged from 40 days to 18 years. All symptomatic patients were receiving biotin supplementation (10–20 mg/day) at the time of the study. Of the 71 unrelated patients, 5 (7%) had consanguineous parents; one (1.4%) had a family history suggestive of BD (the patient had an older sister who died at 3 years old with a clinical picture consistent with BD but with no biochemical or genetic diagnosis), and one (1.4%) had a confirmed family history of BD (the pair of siblings included in the study).

The biotinidase activity (quantitative assay) and observed biochemical phenotype were determined for 65/72 patients (Table 1). Four (6.1%) patients were classified as profound BD, 19 (29.2%) as partial BD, 34 (52.3%) as heterozygous, six (9.2%) as borderline activity (three between partial BD and heterozygous and three between heterozygous and normal activity), and two (3%) as abnormal activity at inclusion in the study but normal thereafter (patients with genotypes 08 and 36 in Table 1). The frequency of partial BD tended to be higher in the South Brazilian region (38.9%) than in the Southeast (20%) and Northeast (14.3%), although this was not statistically significant (exact p-value = 0.198).

Among all patients, 22 (14 male, 8 female) had more than one biotinidase activity measurement (Table 3). The median difference in age between the first and second blood collection was 70 days (range: 2 to 572 days), and the median difference in biotinidase activity was 9.3% (range: -41.3 to 82.7%). The classification of 11 (9 male, 2 female) patients changed to a better or worse enzyme activity classification between consecutive tests. The changes occurred between the first and second blood collection, with most showing improvement, i.e., moving from a more to a less severe category (n = 8/11). Prematurity and jaundice were present only in the group of patients who moved to a better classification.

BTD variants

Thirty-nine different genotypes were found in the entire group of patients (Table 1). In addition to the variants found in our previous study [12], five known pathogenic variants, one synonymous variant (c.1284C>T or p.Y428Y) and three novel variants were identified in the 34 patients added to this study. The novel variants were c.1337T>C (p.L446P), c.1466A>G (p.N489S) and c.962G>A (p.W321*) in exon 4. The variants p.L446P and p.N489S were not found in the controls and were both considered damaging by PolyPhen-2 (scores of 1 and 0.85, respectively) and Mutation Taster (probability of 0.99 for both) but were tolerated by SIFT (scores of 0.1 and 0.22, respectively).

In the *BTD* promoter region, 5'UTR and exon 1 analyses, three variants in the promoter region were identified: c.-514C>T (rs41284037), c.-315A>G (rs2019160, not shown in Table 1) and c.-183G>A (rs2279841), with allele frequencies of 3.6% (allele T), 99.3% (allele G) and 7.3% (allele A), respectively. Except for one patient (genotype 5 in Table 1, p7 in

Table 1. Biotinidase deficiency: Genotypes and biochemical phenotypes presented by 72 Brazilian patients.

Genotype	Number of patients per genotype	Allele 1 ^a		Allele 2 ^a		Expected biochemical phenotype ^b	Observed biochemical phenotype ^c
		cDNA change	protein change	cDNA change	protein change		
01	2	N	N	N	N	N	<u>Hz</u>
02	2	c.-514C>T	N	N	N	N	<u>Hz</u>
03	1	c.[-183G>A;1413T>C]	p.C471C	N	N	N	Borderline Hz/N
04	1	c.[-183G>A;1413T>C]	p.C471C	c.[-183G>A;1413T>C]	p.C471C	N	NA
05	7	c.1330G>C	p.D444H	N	N	N	Partial (n = 1), <u>Hz</u> (n = 4), Borderline Hz/N (n = 2)
06	1	c.1330G>C	p.D444H	c.-183G>A	N	N	<u>Hz</u>
07	1	c.1330G>C	p.D444H	c.1284C>T	p.Y428Y	N	<u>Hz</u>
08	16	c.1330G>C	p.D444H	c.1330G>C	p.D444H	Hz	NA (n = 5), Borderline Partial/Hz (n = 1), Hz (n = 9), <u>N</u> (n = 1)
09	1	c.278A>G	p.Y93C	N	N	Hz	Borderline Partial/Hz
10	1	c.643C>T	p.L215F	N	N	Hz	Hz
11	1	c. [-183G>A;595G>A;1413T>C]	p.[V199M; C471C]	N	N	Hz	Hz
12	1	c.1368A>C	p.Q456H	c.-514C>T	N	Hz	Hz
13	1	c.1595C>T	p.T532M	c.[-514C>T;-183G>A]	N	Hz	Hz
14	1	c.[1330G>C;511G>A]	p.[D444H; A171T]	c.[-183G>A;1413T>C]	p.C471C	Hz	Hz
15	1	c.1481A>G	p.Y494C	c.[-183G>A;1413T>C]	p.C471C	Hz	Hz
16	1	c.1330G>C	p.D444H	c.98_104delinsTCC	p.C33fs	Partial	Partial
17	6	c.1330G>C	p.D444H	c.755A>G	p.D252G	Partial	Partial (n = 4), <u>Hz</u> (n = 2)
18	1	c.1330G>C	p.D444H	c.933delT	p.S311fs	Partial	Partial
19	1	c.1330G>C	p.D444H	c.1368A>C	p.Q456H	Partial	Partial
20	1	c.1330G>C	p.D444H	c.1629C>A	p.D543E	Partial	<u>Hz</u>
21	2	c.1330G>C	p.D444H	c.[1330G>C;470G>A]	p. [D444H; R157H]	Partial	Partial
22	3	c.1330G>C	p.D444H	c.[1330G>C;511G>A]	p. [D444H; A171T]	Partial	NA (n = 1), Partial (n = 1), <u>Hz</u> (n = 1)
23	1	c.1330G>C	p.D444H	c.[1284C>T;1489C>T]	p. [Y428Y; P497S]	Partial	Partial
24	2 (siblings)	c.1330G>C	p.D444H	c.[-183G>A;594_596delCGT]	p. V199del	Partial	Partial
25	1	c.1330G>C	p.D444H	c. [-183G>A;595G>A;1413T>C]	p. [V199M; C471C]	Partial	<u>Hz</u>
26	1	c.1612C>T	p.R538C	c.1612C>T	p.R538C	Profound	Profound
27	1	c.643C>T	p.L215F	c.755A>G	p.D252G	Profound	Profound
28	1	c.755A>G	p.D252G	c.755A>G	p.D252G	Profound	Profound
29	1	c.1227_1241delins11	p.W409fs	c.1227_1241delins11	p.W409fs	Profound	Profound

(Continued)

Table 1. (Continued)

Genotype	Number of patients per genotype	Allele 1 ^a		Allele 2 ^a		Expected biochemical phenotype ^b	Observed biochemical phenotype ^c
		cDNA change	protein change	cDNA change	protein change		
30	1	c.[1330G>C (;) 100G>A]	p.[D444H (;) splice site or G34S]	phase not confirmed		Partial or Hz	Partial
31	1	c.[1330G>C (;) 643C>T]	p.[D444H (;) L215F]	phase not confirmed		Partial or Hz	Hz
32	1	c.[1330G>C (;) 1629C>A]	p.[D444H (;) D543E]	phase not confirmed		Partial or Hz	Hz
33	2	c.[1330G>C (;) 98_104delinsTCC]	p.[D444H (;) C33fs]	phase not confirmed		Partial or Hz	Partial
34	1	c.[962G>A (;) <i>1413T>C</i>]	p.[W321* (;) <i>C471C</i>]	phase not confirmed		Unknown	Hz
35	1	c.664G>A	p.D222N	c. <i>-514C>T</i>	N	Unknown	Hz
36	1	c.1337T>C	p.L446P	c.[<i>-183G>A;1413T>C</i>]	p. <i>C471C</i>	Unknown	N
37	1	c.1330G>C	p.D444H	c.119T>C	p.L40P	Unknown	Partial
38	1	c.1330G>C	p.D444H	c.479G>A	p.C160Y	Unknown	Borderline Partial/ Hz
39	1	c.[1330G>C;511G>A]	p.[D444H; A171T]	c.1466A>G	p.N489S	Unknown	Partial

Novel variants are in bold; non-pathogenic variants are in italics. N, normal; Hz, heterozygous; NA, not available.

^a For the variant c.-315A>G (not shown), the alleles presented the nucleotide G except for one patient with genotype 5 (dp7) who was heterozygous for this variant (the allele A was in *trans* with the variant c.1330G>C).

^b According to the literature, see Wolf (2012).

^c The observed biochemical phenotype is underlined when it does not agree (it is better or worse) with the expected biochemical phenotype according to genotype; see Table 2 for more details. The following enzyme activity ranges (in nmol/min/mL) were used for the classification of the biochemical phenotype (percentage in relation to the mean value of normality): <0.75 (<10%, profound deficiency); 0.75–2.25 (10–30%, partial deficiency); 2.26–4.99 (30.1–66.5%, heterozygosity). Any value in the normal range (5.0–10) was considered as corresponding to 100% of the normal activity. Values within ± 0.1 of a cut-off point were classified as borderline.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177503.t001>

Table 3) who was heterozygous for the variant c.-315A>G, all other patients were homozygous for allele G.

Among known pathogenic variants, the most frequent were c.1330G>C (p.D444H), c.755A>G (p.D252G) and c.[1330G>C;511G>A] (p.[D444H;A171T]), with allele frequencies of 46.7%, 5.8% and 3.6%, respectively. The frequency of p.D444H (not considering this variant in complex alleles) tended to decrease in patients from the South (51.2%) to the Southeast (44.8%) and Northeast regions of the country (35.7%), although these differences were not statistically significant (exact p-value = 0.38).

Since 11 patients had variants of unknown phase (genotypes 30–33, Table 1) and/or variants not described previously (genotypes 34–39, Table 1), the expected biochemical phenotype could be determined for only 61/72 patients. Based on genotype, four patients (6.5%) were expected to present profound BD, 19 (31.1%) to present partial BD, 23 (37.7%) to present heterozygous activity (of these, 16 were homozygous for p.D444H), and 15 (24.5%) to present normal activity (of these, nine were heterozygous for p.D444H). Among patients classified as having profound BD, three were from the South and one was from Southeast Brazil. The frequency of patients classified as partial BD according to genotype was not significantly different

Table 2. Clinical information for patients with discordance between the observed and expected biochemical phenotypes (n = 17/72 patients).

	Discordant patient (patient in Table 3)	Genotype in Table 1	Premature	Neonatal jaundice	Age at enzyme activity testing	Origin of patient (region of Brazil)	Site of testing laboratory (region of Brazil)	Clinical signs	Reference
Patients with observed biochemical phenotype worse than expected	dp1	01	No	Yes	1m10d	Northeast	South	No	Present study
	dp2	01	No	NR	18y8m	Southeast	South	Yes	[9]
	dp3	02	No	No	3m10d	Northeast	Northeast	No	Present study
	dp4	02	No	NR	7m	Southeast	South	Yes	[9]
	dp5	05	No	NR	2m	Northeast	South	No	Present study
	dp6 (p1)	05	No	NR	18y2m; 18y7m	Southeast	South	Yes	[9]
	dp7	05	No	NR	NA	Northeast	Northeast	No	Present study
	dp8	05	No	No	NA	Northeast	South	No	Present study
	dp9	05	No	No	NA	Northeast	Southeast	No	Present study
	dp10	06	No	NR	2m	Northeast	South	No	[9]
	dp11	07	No	No	3m27d	Southeast	Southeast	No	Present study
Patients with observed biochemical phenotype better than expected	dp12 (p14)	08	No	No	1m17d; 1y6m	Southeast	South	No	Present study
	dp13	17	No	NR	1y3m	South	Southeast	No	[9]
	dp14 (p16)	17	No	No	2m; 2m16d; 1y	South	South	No	Present study
	dp15 (p22)	20	No	No	NA	Southeast	South	No	Present study
	dp16	22	No	NR	1y	South	Southeast	No	[9]
	dp17	25	No	NR	2m	Northeast	Southeast	No	[9]

y, years; m, months; d, days; NR, not reported; NA, not available.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177503.t002>

among the South (42.9%), the Southeast (21.4%) and the Northeast regions (8.3%) (exact p-value = 0.058).

Association between genotype and biochemical phenotype (Table 1)

Patients with no *BTD* variants or with only polymorphic variants (genotypes 01–03) were found among those patients who had lower than normal biotinidase activity, in the range for heterozygotes. Most patients heterozygous for p.D444H (genotypes 05–07) and homozygous for p.D444H (genotype 08) possessed activity within the heterozygous range. The majority of patients who were compound heterozygous for p.D444H and previously described severe variants (genotypes 16–25) had enzyme activity consistent with partial BD, except for five with heterozygous levels. The recurrent genotypes associated with different biochemical phenotypes are shown in S1 Fig (genotypes 05, 08, 17 and 22).

Among the novel genotypes, the patient who presented heterozygosity of the variant p.W321* (genotype 34) exhibited 56% activity (heterozygous range). An enzyme activity measurement was not available for the patient’s father, who had the same variant. A patient with

Table 3. Clinical information of patients with more than one biotinidase activity measurement (n = 22/72 patients).

	Patient	Genotype in Table 1	Sex	Prematurity	Neonatal jaundice	1 st collection			2 nd collection			3 rd collection		
						Age	Lab	Result	Age	Lab	Result	Age	Lab	Result
1) Patients with the same classification over time	p1	05	F	No	NR	18y2m	2	Hz (50.6%)	18y7m	2	Hz (36%)			
	p2	08	M	No	No	1m7d	1	Hz (37.3%)	1m14d	1	Hz (36%)			
	p3	08	M	No	No	29d	1	Borderline Partial/Hz (29.3%)	1m1d	2	Hz (40%)			
	p4	10	F	No	No	11d	1	Borderline Partial/Hz (29.3%)	1m	2	Hz (45.3%)			
	p5	17	F	No	No	1m5d	1	Partial (14.6%)	3m22d	2	Partial (24%)	1y5m	2	Partial (25.3%)
	p6	21	M	No	No	2m5d	1	Partial (25.3%)	5m26d	2	Partial (25.3%)			
	p7	24	F	No	NR	15d	1	Partial (16%)	22d	1	Partial (25.3%)			
	p8	28	M	No	NR	2m23d	2	Profound (1.3%)	3m	2	Profound (5.3%)	2y7m	2	Profound (4%)
	p9	30	F	No	NR	14d	1	Partial (16%)	7m	2	Partial (26.6%)			
	p10	33	M	No	no	24d	NA	Partial (21.3%)	2m13d	NA	Partial (26.6%)	6m21d	NA	Partial (24%)
	p11	39	F	No	no	1m24d	1	Borderline Profound/Partial (9.3%)	5m15d	2	Partial (18.6%)			
2) Patients with different classifications over time														
2a) from a more to a less severe category	p12	03	M	Yes	NR	1m1d	1	Profound (1.3%)	1m24d	2	Hz (34.6%)	11m27d	2	Borderline Hz/N (65.3%)
	p13	08	M	No	NR	1m22d	1	Borderline Profound/Partial (9.3%)	NA	2	Hz (44%)			
	p14	08	M	No	no	1m17d	NA	Hz (37.3%)	1y6m	2	N (100%)			
	p15	13	M	No	yes	1m7d	1	Partial (20%)	3m18d	1	Hz (38.6%)	11m14d	1	Hz (58.6%)
	p16	17	M	No	no	2m	1	Partial (25.3%)	2m16d	1	Hz (34.6%)	1y	2	Hz (40%)
	p17	19	F	NA	NR	NA	1	Profound (5.3%)	NA	1	Partial (17.3%)	NA	1	Partial (22.6%)
	p18	36	M	No	no	1m26d	1	Partial (21.3%)	NA	2	N (100%)			
	p19	38	M	No	NR	1m	1	Profound (2.6%)	3m10d	2	Partial (22.6%)	8m26d	2	Borderline Partial/Hz (29.3%)

(Continued)

Table 3. (Continued)

	Patient	Genotype in Table 1	Sex	Prematurity	Neonatal jaundice	1 st collection			2 nd collection			3 rd collection		
						Age	Lab	Result	Age	Lab	Result	Age	Lab	Result
2b) from a less to a more severe category	p20	8	M	NA	NR	1y22d	3	Hz (61.3%)	2y1m	1	Partial (20%)			
	p21	8	F	No	no	6m23d	1	Hz (42.6%)	2y1m	4	Partial (26.6%)			
	p22	20	M	No	no	NA	2	Hz (33.3%)	NA	2	Partial (21.3%)			

Lab, laboratory; F, female; M, male; y, years; m, months; d, days; NR, not reported; NA, not available; N, normal; Hz, heterozygous. The following enzyme activity ranges (in nmol/min/mL) were used for the classification of the biochemical phenotype (percentage in relation to the mean value of normality): <0.75 (<10%, profound deficiency); 0.75–2.25 (10–30%, partial deficiency); 2.26–4.99 (30.1–66.5%, heterozygosity). Any value in the normal range (5.0–10) was considered as corresponding to 100% of the normal activity. Values within ± 0.1 of a cut-off point were classified as borderline.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177503.t003>

the p.L446P variant in one allele and the normal sequence in the other (genotype 36, p18) had enzyme activity of 21.3% (partial BD) and in a second sample 100% (normal); his father was also heterozygous for the novel variant and exhibited activity of 100% (normal). The patient who possessed the p.N489S variant also possessed a known pathogenic variant in *trans* (genotype 39, p11) and had enzyme activity of 9.3% (borderline profound/partial BD) and, in a second assay, 18.7% (partial BD); the patient’s father, who was heterozygous for p.N489S, had enzyme activity of 53.3% (heterozygous range).

Comparisons between the expected and observed biochemical phenotype were possible for 54/72 patients, and concordance was observed in 37 (68.5%) cases. The clinical information for patients who were discordant is shown in Table 2. No discordant patients were premature, and neonatal jaundice was reported in only one patient from this group (dp1). Among the patients with an observed biochemical phenotype worse than expected, the biotinidase activity test was performed in a state other than the state of residency for 9/11, and so we assume the plasma samples for these patients underwent a prolonged period of transport prior to the enzyme test being performed. For 5/6 patients with an observed biochemical phenotype better than expected, the biotinidase activity test was also performed in a state other than the state of residency and plasma samples likely also underwent a prolonged period of transport before the enzyme test was performed. Among patients expected to have biotinidase activity in the normal range, patients dp1–dp4 and dp6–dp11 exhibited enzyme activity suggestive of heterozygosity, and dp5 exhibited enzyme activity suggestive of partial BD. Patients dp3 and dp4 showed the c.-514C>T variant, patient dp7 was the only heterozygous patient for c.-315A>G (allele A was in *trans* with the other variant presented), and patient dp10 had the non-coding variant c.-183G>A. Conversely, patient dp12 exhibited normal enzyme activity, and patient dp13–17 showed levels suggestive of heterozygosity (considering the highest result), although their genotypes suggested heterozygous levels and partial BD, respectively. Patient dp17 exhibited the non-coding c.-183G>A variant. Among the 17 discordant patients, the c.-183G>A, c.-315A>G and c.-514C>T variants were present in heterozygosity in two (12%), one (6%) and two (12%) patients, respectively. The c.-183G>A and c.-514C>T variants were also present in eight (22%) and two (5%) of 37 concordant patients, respectively. Patients with borderline biotinidase activity had an expected biochemical phenotype equal to the higher classification. Among patients whose classification changed between consecutive tests (Table 3), the expected biochemical phenotype matched the worst result for 3/9 patients and the best result for 6/9 patients.

In silico evaluation of non-coding variants

The c.-514C>T, c.-315A>G and c.-183G>A variants map to an evolutionarily conserved region in chimpanzee (1,002 bp) and rhesus monkey (3,212 bp), and c.-514C>T is also conserved in dog (228 bp), mouse (444 bp) and rat (221 bp). [S2 Fig](#) shows that the cytosine at position -514 is not conserved in rat; at position -315, there is an adenine or guanine; and at position -183, guanine is not conserved in mouse and rat.

According to *in silico* prediction, the c.-514C>T variant is located in an Sp1 transcription factor (Sp1) binding site, and the T allele creates one more site for Sp1 and two for neurofibromin 1 (NF-1) ([S3A Fig](#)). In the c.-315A>G variant, no binding sites for human transcription factors are predicted, independent of the allele. Finally, allele A of the c.-183G>A variant is predicted to change the site for CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) to a site for CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta) and to create a site for Sp1 ([S3B Fig](#)). The *BTD* gene and the aforementioned transcription factor genes exhibit mRNA expression in most of the tissues assessed in the studies in Gene Cards database. Protein expression differed, however, with NF-1 found in liver and pancreas, C/EBPalpha detected in the liver, and C/EBPdelta and Sp1 present in the pancreas. The transcription factors Sp1 and C/EBPdelta were included in the list of transcription factors identified in the 5' region of the *BTD* gene by the ENCODE CHIP-Seq Significance Tool.

Discussion

Currently, BD is included in many National Neonatal Screening Programs, including the USA, Canada, the Netherlands and the United Arab Emirates [[13](#), [23–25](#)], with the primary goal of identifying profound BD. Screening is performed through measurement of biotinidase activity in dried blood spot samples. There is some controversy regarding the indication of treatment for partial BD patients, but currently, in essentially all programs, it is recommended that these children be treated with biotin [[26](#)]. In the literature, there is no consensus regarding the stage at which *BTD* gene analysis should be performed. This is in part due to misconceptions about the linearity of the genotype-phenotype relationship and predictions. In addition, the necessity of determining the *cis/trans* status of the mutations identified in patients is usually not stressed.

In Brazil, BD has been included in the National Neonatal Screening Program since 2012, and the classifications of profound BD, partial DB, and heterozygous activity are applied to test results. This classification is directly related to therapeutic decision-making: profound and partial BD patients are given oral biotin supplements, but individuals with activities in the heterozygous range are not. The labelling of asymptomatic individuals who present with less than 30% residual biotinidase activity as patients and prescribing life-long treatment is an issue that concerns health professionals. Our data suggest that in Brazil, neonatal screening is identifying mainly individuals with partial DB and heterozygous activity and that biotinidase activity is not always successful in differentiating between the different disease severities.

Genotype-biochemical phenotype association

In our study, the genotype-biochemical phenotype association is not always consistent. For example, some patients who presented with the same genotype had different biochemical phenotypes. Patient dp12 (genotype 08), who presented with normal activity despite homozygosity for D444H, is an interesting case, having only been described once before [[23](#)].

Neonatal jaundice, prematurity and transportation conditions of collected sample do not appear to be the main causes of the discordance between the observed and expected biochemical phenotypes because none of the discordant patients was premature, and only one

discordant patient experienced jaundice. In addition, for patients with biotinidase activity that was both worse and better than expected, the biotinidase activity test had been performed on samples that underwent a period of transport to another state before analysis.

The variants we identified in the promoter region of *BTD* do not seem to have a relevant effect on biotinidase activity. However, it cannot be excluded that the variant c.-514C>T contributes to a subtle decrease in gene expression since patients without pathogenic mutations (dp3 and dp4) and heterozygous for this variant have activities consistent with heterozygosity. The c.-315A>G (allele A) might also have a subtle decreasing effect since it was only present in a discordant patient who presented with an activity worse than expected (dp7).

The bioinformatics analysis suggested that the c.-514C>T variant is located in a more evolutionarily conserved region than the other variants and that the c.-514C>T and c.-183G>A variants might be critical for transcription factor binding. The co-expression of biotinidase and transcription factors predicted to have binding sites that are created or abolished by these variants reinforces the likelihood of these variants affecting *BTD* gene expression, but further studies are needed.

Non-genetic modifier factors

Our data on consecutive tests performed on the same patient suggest that enzyme activity increases with age, in particular during the neonatal period. In addition, prematurity and neonatal jaundice might have contributed to the first lower results. Schulpis et al. [5] suggest that the reduced biotinidase activity in jaundiced babies may be due to impaired liver function and that high concentrations of total bilirubin in plasma may act as an inhibitor of biotinidase.

Our data does not support the concept that male babies have lower biotinidase activity due to a higher degree of hepatic immaturity since the majority of patients whose condition changed to a better or to a worse classification were male. It is important to note that the comparison of consecutive measurements could be biased since the reason for performing a second test was not always clear, and consecutive tests were not always performed by the same laboratory.

Genetic data

The *BTD* gene variants p.D444H, p.D252G and p.[D444H;A171T] accounted for 56% of the known pathogenic alleles in this study. These variants were also among the most frequent identified in the Brazilian sample evaluated by Neto et al. [10] (n = 21). The frequencies of p.D444H, partial BD and partial BD according to genotype tend to decrease from the South to the Southeast and from the Southeast to the Northeast. Swango et al. [27] observed p.D444H more frequently in patients whose parents were of German descent, suggesting a potential founder effect. According to “The 1000 Genomes Project (Phase 3)”, the p.D444H allele frequency differs among populations, with 4% prevalence in European populations, to 2–3% in South Asian and American populations (excluding Brazilians) and zero in African and East Asian populations. European ancestry is the major contributor to the genetic background of Brazilians (followed by African and Amerindian ancestries), and the South has a greater European contribution than the Southeast and Northeast [28]. These geographical differences provide a likely explanation for the apparent difference in p.D444H frequencies observed in Brazil. The frequency of p.D444H in the Brazilian population from the South is 4% [12], but similar data are not available for the populations of other regions.

The novel variants p.L446P and p.N489S do not appear to be polymorphic in the Brazilian population. The *in silico* pathogenicity predictions for the variant p.L446P are divergent, but based on the enzyme activity exhibited by the patient and his father, this variant appears to be

non-pathogenic. The variant p.N489S is located at a potential N-linked glycosylation site [29] and could be considered mildly pathogenic, similar to p.D444H, according to the patient's highest activity (partial BD), although the patient's first biotinidase activity measurement was compatible with profound BD, and the activity shown by the patient's father was at the level of heterozygosity. Previously, another nucleotide substitution in the same position, c.1466A>C (p.N489T), was reported and considered pathogenic [30]. The novel variant p.W321* creates a stop codon at the end of the nitrilase/amidase homologous domain (which reaches amino acid 367), and thus this variant must be considered pathogenic.

Exon 1 contains the first translation start site and encodes the peptide signal. Some groups have analysed the initial portion of the *BTD* gene in patients with BD [31–34]. These studies observed a point variant in the promoter [32] and another in the 5'UTR [35]. In addition, a 107-kb contiguous deletion including the promoter, exon 1 and a portion of intron 1 of the *BTD* gene, the entire *HACL1* gene and a small portion of the of the *COLQ* gene [36] have been reported. Previous studies in Brazil have not identified variants in the 5'UTR and exon 1 [9, 10], and variants in these regions were not observed in the larger and more diverse sample examined in the present study. This is the first study to sequence the *BTD* promoter in Brazilian patients with reduced biotinidase activity, and the c.-514C>T, c.-315A>G and c.-183G>A variants were identified and are considered polymorphic based on their frequencies of 6% (allele T), 96% (allele G) and 17% (allele A) in “The 1000 Genomes Project (Phase 3)”, respectively.

Conclusion

Our data suggest that biotinidase activity increases with age and that prematurity and neonatal jaundice might decrease biotinidase activity. The expected and observed biochemical phenotypes agreed in nearly 70% of cases. Neonatal jaundice, prematurity, transportation of the sample and non-coding variants do not appear to be the main causes of the discordance between the genotype and biochemical phenotype in our study. The disparity between the genotype and biochemical phenotype reinforces the idea that BD should be diagnosed using biotinidase activity. Since enzyme activity can be influenced by various factors, we recommend performing more than one biotinidase activity measurement, preferably in the same laboratory, with at least one sample collected after the neonatal period, and the highest enzyme activity result should be used for classification. In the context of BD treatment, DNA analysis of the patient and parents may be useful after the second biotinidase activity measurement if the result is approximately 30% of normal activity to gather further evidence for partial BD and consequent treatment intervention.

Supporting information

S1 Fig. Biotinidase activity of recurrent genotypes associated with different biochemical classifications. Profound Deficiency–biotinidase activity <10%, Partial Activity–biotinidase activity 10–30%, Heterozygous–biotinidase activity 30.1–66.5%. Any value in the normal range (5.0–10 nmol/min/mL) was considered 100% of the normal activity.
(TIF)

S2 Fig. Multiple alignment of the human (*Homo sapiens*), chimpanzee (*Pan troglodytes*), rhesus monkey (*Macaca mulatta*), mouse (*Mus musculus*) and rat (*Rattus norvegicus*) *BTD* gene sequences. A, B and C show the positions of the non-coding c.-514C>T, c.-315A>G and c.-183G>A variants, respectively.
(TIF)

S3 Fig. Output of the prediction tool for transcription factor binding sites (Alibaba) for the region of the variants c.-514C>T (A) and c.-183G>A (B). * The transcription factor REB1 is not a human protein. (TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. Barry Wolf for his contribution by reviewing and discussing the main points of the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: IVDS HJB.

Formal analysis: TB.

Funding acquisition: IVDS.

Investigation: TB FS SEL MRSC PASF JSCJ ER PFVM CML CFMS RB TMF CMB LLCP ECN.

Supervision: FS.

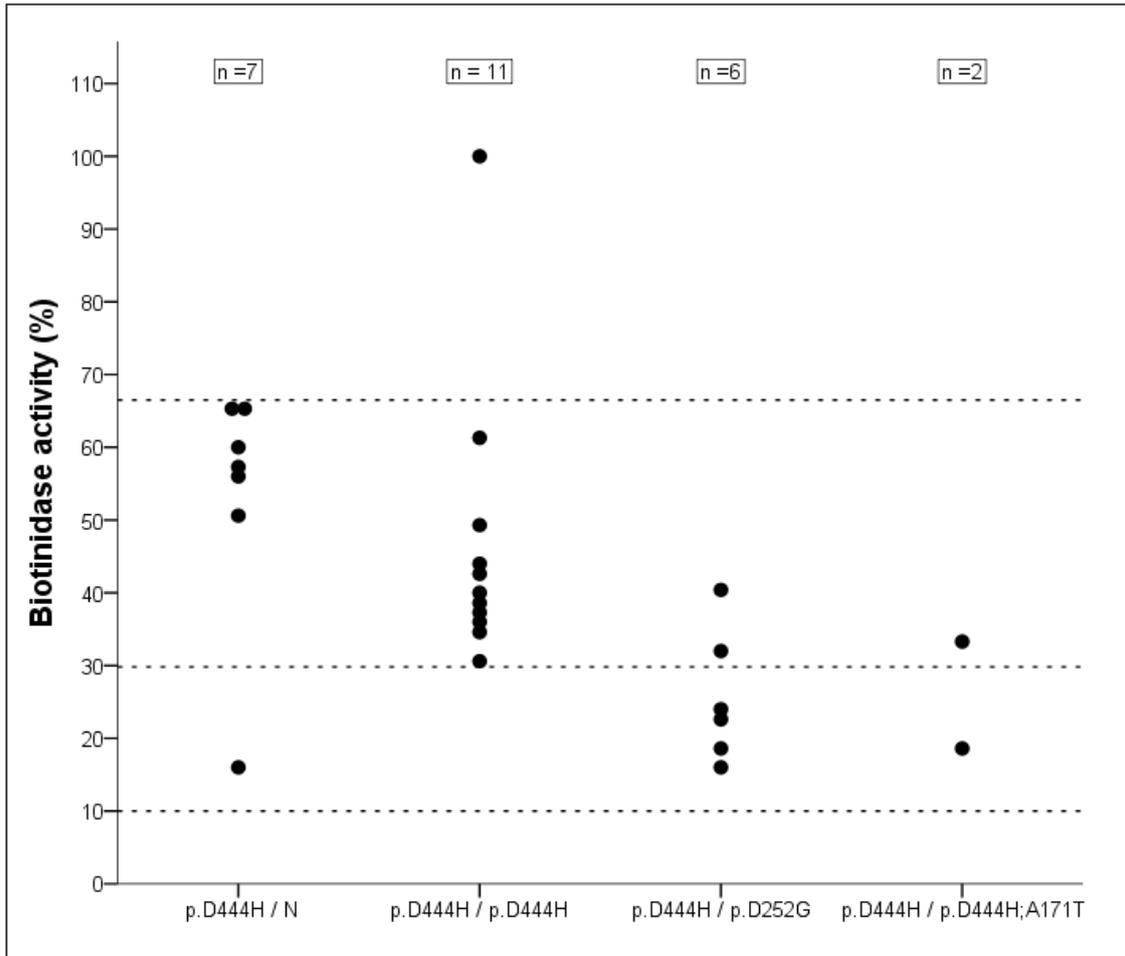
Writing – original draft: TB IVDS HJB.

References

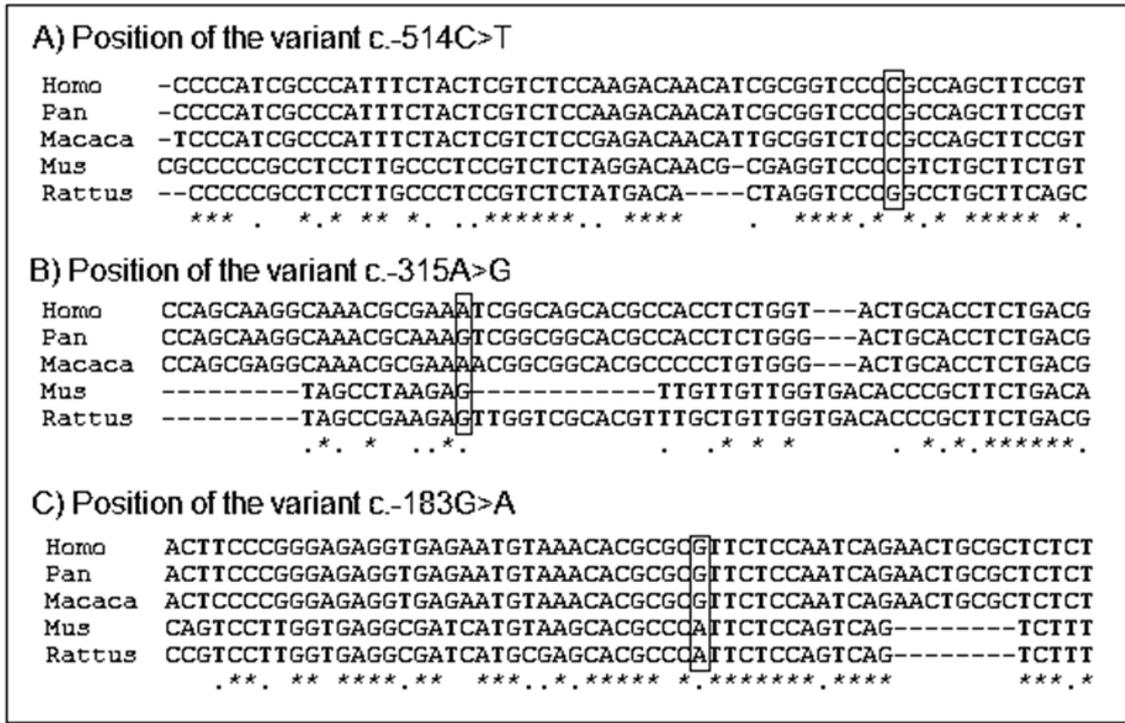
1. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1996; 255(1):1–11. Epub 1996/11/15. PMID: [8930409](#)
2. Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1983; 131(3):273–81. Epub 1983/07/15. PMID: [6883721](#)
3. Wastell HJ, Bartlett K, Dale G, Shein A. Biotinidase deficiency: a survey of 10 cases. *Archives of disease in childhood*. 1988; 63(10):1244–9. Epub 1988/10/01. PubMed Central PMCID: PMC1779020. PMID: [3196050](#)
4. Suormala T, Wick H, Baumgartner ER. Low biotinidase activity in plasma of some preterm infants: possible source of false-positive screening results. *European journal of pediatrics*. 1988; 147(5):478–80. Epub 1988/06/01. PMID: [3409923](#)
5. Schulpis KH, Gavriili S, Tjamouranis J, Karikas GA, Kapiki A, Costalos C. The effect of neonatal jaundice on biotinidase activity. *Early Human Development*. 2003; 72(1):15–24. PMID: [12706308](#)
6. Cowan TM, Blitzer MG, Wolf B, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2010; 12(7):464–70.
7. Wolf B. 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*. 2012; 14(6):565–75.
8. Li H, Spencer L, Nahhas F, Miller J, Fribley A, Feldman G, et al. Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by newborn screening in Michigan including a unique intronic mutation that alters mRNA expression of the biotinidase gene. *Mol Genet Metab*. 2014; 112(3):242–6. Epub 2014/05/07. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.04.002> PMID: [24797656](#)
9. Lara MT, Gurgel-Giannetti J, Aguiar MJ, Ladeira RV, Carvalho NO, Del Castillo DM, et al. High Incidence of Biotinidase Deficiency from a Pilot Newborn Screening Study in Minas Gerais, Brazil. *JIMD reports*. 2015. Epub 2015/05/15.
10. Neto EC, Schulte J, Rubim R, Lewis E, DeMari J, Castilhos C, et al. 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]*. 2004; 37(3):295–9. Epub 2004/04/03.

11. Thodi G, Schulpis KH, Molou E, Georgiou V, Loukas YL, Dotsikas Y, et al. High incidence of partial biotinidase deficiency cases in newborns of Greek origin. *Gene*. 2013; 524(2):361–2. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.059> PMID: 23644139
12. Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Pinto LL, Luca GR, Carvalho FL, Souza CF, et al. Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 Brazilian patients. *BMC medical genetics*. 2014; 15:96. Epub 2014/09/02. PubMed Central PMCID: PMC4236587. <https://doi.org/10.1186/s12881-014-0096-3> PMID: 25174816
13. Gannavarapu S, Prasad C, DiRaimo J, Napier M, Goobie S, Potter M, et al. Biotinidase deficiency: Spectrum of molecular, enzymatic and clinical information from newborn screening Ontario, Canada (2007–2014). *Mol Genet Metab*. 2015; 116(3):146–51. Epub 2015/09/13. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.08.010> PMID: 26361991
14. Brasil MdS. Triagem neonatal biológica: manual técnico. In: Departamento de Atenção Especializada e Temática SdAaS, editor. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2016. p. 80.
15. Brasil MdS. Triagem neonatal: deficiência de biotinidase In: Departamento de Atenção Especializada e Temática SdAaS, editor. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. p. 32.
16. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*. 2010; 7(4):248–9. PubMed Central PMCID: PMC2855889. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248> PMID: 20354512
17. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols*. 2009; 4(7):1073–81. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86> PMID: 19561590
18. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature methods*. 2014; 11(4):361–2. Epub 2014/04/01. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890> PMID: 24681721
19. Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic acids research*. 2004; 32(Web Server issue):W280–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh355> PMID: 15215395
20. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular biology and evolution*. 2013; 30(4):772–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010> PMID: 23329690
21. Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, Iny Stein T, Shmoish M, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator. *Database*. 2010;2010.
22. Auerbach RK, Chen B, Butte AJ. Relating Genes to Function: Identifying Enriched Transcription Factors using the ENCODE ChIP-Seq Significance Tool. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2013.
23. Al-Jasmi FA, Al-Shamsi A, Hertecant JL, Al-Hamad SM, Souid AK. Inborn Errors of Metabolism in the United Arab Emirates: Disorders Detected by Newborn Screening (2011–2014). *JIMD reports*. 2015. Epub 2015/11/22.
24. Wolf B. Successful outcomes of older adolescents and adults with profound biotinidase deficiency identified by newborn screening. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2016. Epub 2016/09/23.
25. Wiltink RC, Kruijshaar ME, van Minkelen R, Onkenhout W, Verheijen FW, Kemper EA, et al. Neonatal screening for profound biotinidase deficiency in the Netherlands: consequences and considerations. *European journal of human genetics: EJHG*. 2016; 24(10):1424–9. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.65> PMID: 27329734
26. Wolf B. Why screen newborns for profound and partial biotinidase deficiency? *Molecular genetics and metabolism*. 2015; 114(3):382–7. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.01.003> PMID: 25638506
27. Swango KL, Demirkol M, Huner G, Pronicka E, Sykut-Cegielska J, Schulze A, et al. Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene. *Human genetics*. 1998; 102(5):571–5. Epub 1998/07/08. PMID: 9654207
28. Rodrigues de Moura R, Coelho AVC, de Queiroz Balbino V, Crovella S, Brandão LAC. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *American Journal of Human Biology*. 2015; 27(5):674–80. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22714> PMID: 25820814
29. Cole H, Reynolds TR, Lockyer JM, Buck GA, Denson T, Spence JE, et al. Human serum biotinidase. cDNA cloning, sequence, and characterization. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269(9):6566–70. Epub 1994/03/04. PMID: 7509806
30. Pomponio RJ, Yamaguchi A, Arashima S, Hymes J, Wolf B. Mutation in a putative glycosylation site (N489T) of biotinidase in the only known Japanese child with biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab*. 1998; 64(2):152–4. Epub 1998/08/15. <https://doi.org/10.1006/mgme.1998.2706> PMID: 9705240

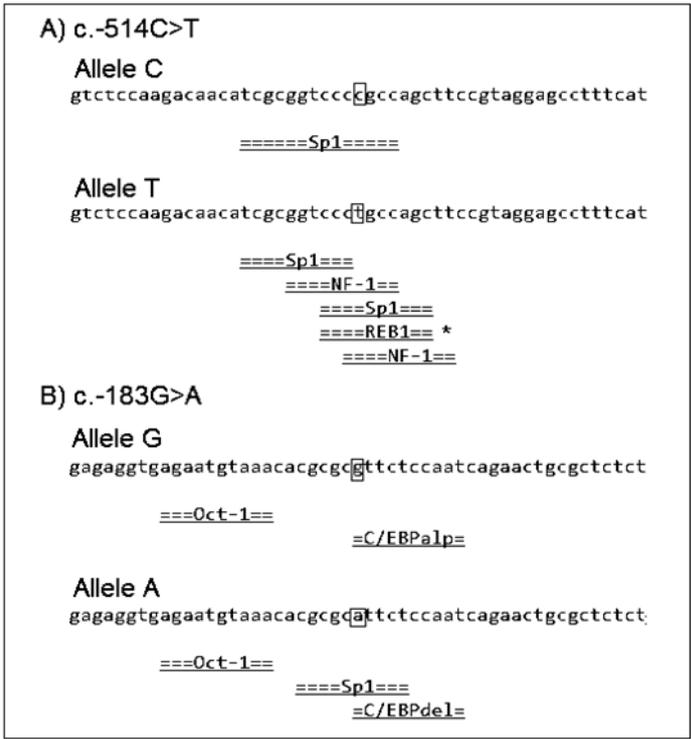
31. Iqbal F, Item CB, Vilaseca MA, Jalan A, Muhl A, Couce ML, et al. The identification of novel mutations in the biotinidase gene using denaturing high pressure liquid chromatography (dHPLC). *Mol Genet Metab*. 2010; 100(1):42–5. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.12.016> PMID: 20083419
32. Muhl A, Moslinger D, Item CB, Stockler-Ipsiroglu S. Molecular characterisation of 34 patients with biotinidase deficiency ascertained by newborn screening and family investigation. *European journal of human genetics: EJHG*. 2001; 9(4):237–43. Epub 2001/04/21. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200620> PMID: 11313766
33. Wolf B, Jensen K, Hüner G, Demirkol M, Baykal T, Divry P, et al. Seventeen novel mutations that cause profound biotinidase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2002; 77(1–2):108–11. PMID: 12359137
34. Ye J, Wang T, Han LS, Qiu WJ, Zhang HW, Zhang YF, et al. Diagnosis, treatment, follow-up and gene mutation analysis in four Chinese children with biotinidase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*. 2009; 32 Suppl 1:S295–302.
35. Procter M, Wolf B, Mao R. Forty-eight novel mutations causing biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2016; 117(3):369–72. Epub 2016/01/27. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.01.002> PMID: 26810761
36. Senanayake DN, Jasinge EA, Pindolia K, Wanigasinghe J, Monaghan K, Suchy SF, et al. First contiguous gene deletion causing biotinidase deficiency: The enzyme deficiency in three Sri Lankan children. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. 2015; 2:81–4.



S1 Fig. Biotinidase activity of recurrent genotypes associated with different biochemical classifications. Profound Deficiency-biotinidase activity <10%, Partial Activity-biotinidase activity 10-30%, Heterozygous-biotinidase activity 30.1-66.5%. Any value in the normal range (5.0-10 nmol/min/mL) was considered 100% of the normal activity.



S2 Fig. Multiple alignment of the human (*Homo sapiens*), chimpanzee (*Pan troglodytes*), rhesus monkey (*Macaca mulatta*), mouse (*Mus musculus*) and rat (*Rattus norvegicus*) *BTD* gene sequences. A, B and C show the positions of the non-coding c.-514C>T, c.-315A>G and c.-183G>A variants, respectively.



S3 Fig. Output of the prediction tool for transcription factor binding sites (Alibaba) for the region of the variants c.-514C>T (A) and c.-183G>A (B). * The transcription factor REB1 is not a human protein.

11 CAPÍTULO 2: Effect of *BTD* gene variants on *in vitro* biotinidase activity

O capítulo 2 consiste na avaliação funcional da variante mais frequente (c.1330G>C ou p.Asp444His) na DB, e de variantes novas do gene *BTD*. Este capítulo será apresentado na forma de artigo, o qual será submetido para a revista *Molecular Genetics and Metabolism*, cujo fator de impacto é 3,76 e o Qualis CAPES da área de genética (Ciências biológicas I) é B1. O formato obedece às normas de submissão da revista.

12 CAPÍTULO 3: Plasma metabolites in patients with partial biotinidase deficiency

O capítulo 3 consiste em estudo bioquímico especificamente de pacientes com atividade da biotinidase correspondente a DB parcial. Este capítulo será apresentado na forma de artigo (*research report*), o qual será submetido para a revista Journal of Inherited Metabolic Disease (JIMD), cujo fator de impacto é 3,97 e o Qualis CAPES da área de genética (Ciências biológicas I) é A2. O formato obedece às normas de submissão da revista.

13 DISCUSSÃO

No Brasil, a BD foi incluída no Programa Nacional de Triagem Neonatal no ano de 2012 e a classificação correta (DB total, DB parcial, heterozigotos) dos pacientes assintomáticos com atividade reduzida da biotinidase preocupa os especialistas. Isso acontece porque o resultado da atividade enzimática pode sofrer diferentes interferências (biológicas e ambientais, a exemplo da prematuridade e temperatura de armazenamento da amostra) e sua classificação está diretamente relacionada à tomada de decisão terapêutica: DB total e parcial são tratadas, mas heterozigotos não.

A análise genética tem sido apontada como um teste complementar para o diagnóstico, importante na avaliação de bebês prematuros e de bebês que passaram por transfusão de sangue. 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 plasma/soro utilizadas no teste enzimático (Cowan *et al.*, 2010; Wolf, 2010). A análise genética ainda não está disponível no país, a não ser por projetos de pesquisa e em alguns laboratórios privados. O estudo apresentado no Capítulo 1 desta tese buscou uma melhor compreensão sobre a relação genótipo-fenótipo bioquímico na DB para orientação sobre aplicação da análise genética no diagnóstico.

Foi caracterizado o perfil clínico e genético de indivíduos brasileiros com atividade reduzida da biotinidase identificados por triagem neonatal, além de alguns pacientes identificados por suspeita clínica, e avaliada a associação genótipo-fenótipo bioquímico. O grupo de pacientes anteriormente estudado foi ampliado, assim, este trabalho forneceu dados sobre a maior amostra de pacientes brasileiros já analisados. Além de indivíduos com atividade enzimática nas faixas da DB total e parcial, foram incluídos 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 genético para a família.

A amostra (amostragem por conveniência) foi composta em sua maioria por indivíduos com atividade intermediária entre a DB parcial e o limite inferior da normalidade (atividade correspondente a heterozigotos), seguida da DB

parcial, e depois da DB total. Com base na nossa amostra, sugere-se que a triagem neonatal no Brasil está identificando principalmente indivíduos heterozigotos e com DB parcial. Indivíduos que apresentaram valor dentro da normalidade já no primeiro teste confirmatório não foram recrutados, e não temos conhecimento da proporção desses casos. Na Holanda, a triagem neonatal para DB foi iniciada em 2007 e o trabalho publicado em 2016 mostrou que a maioria dos resultados alterados foram falsos-positivos (45,7%) - ou seja, acima de 30% de atividade - e DB parcial (47,8%). Segundo os autores, isso gerou uma carga grande e desnecessária sobre os pais e o sistema de saúde. Apenas 6,5% foram diagnosticados com DB total. Em 2012, o valor de corte para triagem já havia sido reduzido, e os autores sugeriram reduzir novamente (Wiltink *et al.*, 2016). Os dados relativos à triagem no Brasil através do PNTN, que tem cobertura em torno de 83% dos NV (dado de 2015), não estão disponíveis. É possível que aqui também uma parte muito grande dos resultados alterados seja de falsos-positivos. Essa é uma informação de suma importância em vista das despesas com testes confirmatórios e da ansiedade gerada nas famílias.

Este estudo não foi desenhado de forma que permita calcular a incidência da DB, mas como o número de pacientes que participaram da pesquisa com atividade de DB parcial (incluindo *borderline* DB parcial/heterozigoto) foi 5,5 vezes maior do que o número de pacientes com atividade de DB total, a DB parcial parece ser muito mais frequente, assim como foi constatado nos estudos realizados em Michigan nos EUA (DB parcial= 1:16.533 NV, DB total= 1:101.779 NV) (Jay *et al.*, 2015) e oeste da Hungria (DB parcial= 1:23.000 NV, DB total= 1:97.000 NV) (Milánkovics *et al.*, 2010). Isso pode ser explicado pela alta frequência do alelo c.1330G>C (p.Asp444His), associado a DB parcial, na população (frequência alélica no Rio Grande do Sul: 4%, São Paulo: 2,7%).

Na tabela 3 da Introdução, foram mostradas as cinco variantes mais frequentes em pacientes com DB em estudos dos EUA, e as frequências alélicas em outros países – variantes: c.98_104del7ins3, c.1612C>T, c.1368A>C, c.[511G>A;1330G>C], c.1330G>C. No presente estudo, as variantes patogênicas mais frequentes em pacientes com atividade reduzida da biotinidase (n= 71, não relacionados) foram: c.1330G>C (frequência alélica:

46%), c.755A>G (5,8%) e c.[1330G>C;511G>A] (3,6%). As variantes c.98_104del7ins3, c.1612C>T e c.1368A>C apareceram com frequências baixas. Considerando apenas pacientes com atividade enzimática de DB parcial e total (n= 25, não relacionados), como foi feito na tabela 3, as frequências alélicas foram: 6% para c.98_104del7ins3, 4% para c.1612C>T, 2% para c.1368A>C, 4% para c.[1330G>C;511G>A], 37% para c.1330G>C, e 12% para c.755A>G. A c.1368A>C é menos frequente em pacientes brasileiros, enquanto que a c.755A>G se destaca.

Tomando as associações de genótipos e fenótipos propostas pelo *expert* Prof. Barry Wolf como regra geral (apresentadas na figura 5 da Introdução), verificou-se que 68.5% dos casos seguiram essa regra no nosso estudo, ou seja, em aproximadamente 70% dos casos existiu concordância entre o genótipo (ou fenótipo esperado conforme o genótipo) e fenótipo bioquímico. Quando indivíduos que apresentam as mesmas variantes (genótipo) foram comparados entre si, observou-se que eles pertencem a diferentes classes de fenótipo bioquímico. Revisando a literatura, verificou-se que este foi o primeiro estudo a abordar a associação genótipo *versus* fenótipo na DB desta forma. De modo que a maioria dos estudos publicados apresenta os dados de genótipo e atividade enzimática dos participantes, foi possível aplicar a regra geral e calcular a associação para cada um deles. Foram excluídos os estudos em que as classes fenotípicas dos participantes não estavam claramente informadas (e não havia informação suficiente sobre valores de referência para definir as classes); e foram excluídos os pacientes que apresentavam variantes novas e, portanto, não se conhecia o efeito patogênico. Tomando em conjunto sete estudos (realizados em diferentes países: EUA, Canadá, Holanda, Itália, Hungria e Irã) que avaliaram pacientes com variados níveis de atividade da biotinidase por sequenciamento, a concordância ocorreu em média em 88% dos casos (intervalo: 62-100%) (Swango *et al.*, 1998; Norrgard *et al.*, 1999; Milankovics *et al.*, 2007; Gannavarapu *et al.*, 2015; Wiltink *et al.*, 2016; Asgari *et al.*, 2016; Porta *et al.*, 2017). Nos estudos brasileiros previamente publicados foi verificada concordância em 83% e 66% dos casos (Neto *et al.*, 2004; Lara *et al.*, 2015).

No estudo de Thodi *et al.* (2013), em pacientes gregos, a homozigose para c.1330G>C (p.Asp444His) foi associada à DB parcial; essa associação

ocorreu em 11 de 16 pacientes com DB parcial. Nesse estudo foi realizada pesquisa direcionada de mutações em vez de sequenciamento do gene *BTD*, a qual não inclui a pesquisa da alteração c.511G>A, que é encontrada em *cis* com a c.1330G>C (constituindo um alelo com efeito grave ou de deficiência total). Embora os autores não tenham discutido no artigo, é possível que, nos pacientes homocigotos para c.1330G>C (p.Asp444His), um dos alelos seja o alelo complexo c.[1330G>C;511G>A]. Por essa limitação, o estudo não foi incluído na análise descrita no parágrafo anterior.

O presente estudo sugere que, nas condições como é realizado o diagnóstico bioquímico (atividade enzimática) e com o método de análise genética aplicado, a associação genótipo-fenótipo bioquímico para pacientes brasileiros é inconsistente. Não foi realizada investigação de grandes deleções ou duplicações, assim como também não foi realizada nos trabalhos usados como comparativo, porque essas alterações são muito raras (apenas duas mutações deste tipo foram relatadas em duas famílias). A maioria dos pacientes “discordantes” apresentou fenótipo bioquímico de heterocigoto. Especula-se que a porcentagem de concordância verificada pode ter sido mais baixa do que em outros estudos porque, na nossa amostra, indivíduos com fenótipos mais leves foram mais representativos. O achado para DB condiz com o que é relatado para outros EIM. De modo geral, os EIM são condições com grande variabilidade fenotípica, e muitas vezes a associação genótipo-fenótipo não é consistente, até mesmo entre membros de uma mesma família (Weiner, 2017). Em vista disso, a análise genética não substitui a medida da atividade da biotinidase. Para este teste, além dos cuidados com armazenamento da amostra, é recomendado que cada laboratório estabeleça intervalos de referência para cada uma das categorias enzimáticas (Strovel *et al.*, 2017).

Verificou-se também que o resultado da atividade enzimática pode aumentar do primeiro para o segundo teste. Este achado reforça a recomendação de que um intervalo de referência específico para recém-nascidos seja estabelecido, já que foi descrito que recém-nascidos a termo têm 50-70% da média da atividade normal em adultos (Strovel *et al.*, 2017).

No Capítulo 2 desta tese, avaliamos o impacto funcional de variantes gênicas novas, além da variante comum c.1330G>C (p.Asp444His), através de mutagenese sítio dirigida e expressão *in vitro*. O efeito das variantes

previamente relatadas em pacientes com DB tem sido estimado por associação com a atividade enzimática em plasma/soro apresentada pelos pacientes. Tal estratégia é particularmente informativa quando o paciente é homocigoto e se o genótipo é recorrente. As variantes novas avaliadas neste estudo foram encontradas em heterocigose composta e a atividade enzimática é o resultado da expressão de ambos os alelos, que podem ter efeitos diferentes.

A expressão do gene *BTD* em linhagem celular (HEK 293), através de um método convencional, mostrou-se efetiva. A detecção de atividade enzimática e proteína no meio de cultura, além do lisado celular, mostra que a biotinidase é secretada por células HEK 293. Não foi detectada atividade endógena de biotinidase, o que simplifica a interpretação dos resultados. Além disso, o meio de cultura clássico DMEM foi utilizado uma vez que nenhum cofator para a enzima biotinidase é conhecido. Caso contrário, moléculas que atuam como cofatores, presentes no meio de cultura, poderiam estabilizar a enzima e mascarar o efeito deletério das mutações.

Os resultados sugeriram que as variantes p.Leu40Pro, p.Cys160Tyr e p.Leu446Pro têm efeito deletério, e que as variantes p.Asp222Asn, p.Asp444His e p.Asn489Ser não são deletérias. A variante p.Asn489Ser, apesar de não ser classificada como deletéria, resultou em uma atividade reduzida (40%) da biotinidase em meio de cultura, a qual concordou com a atividade esperada para a variante conforme a atividade em plasma do paciente. Portanto, a variante p.Asn489Ser pode estar associada à DB parcial quando em heterocigose composta com um alelo deletério. A variante comum, p.Asp444His, diferentemente do esperado, apresentou atividade alta (100%) em meio de cultura e mais estudos são necessários para esclarecimento do seu efeito. Podem existir outros fatores afetando a sua patogenicidade, tais como labilidade térmica. No artigo, foram discutidos possíveis mecanismos de patogenicidade com base nas características dos aminoácidos alterados e posições das alterações na estrutura da enzima. Como a atividade da biotinidase em plasma/soro (portanto, extracelular) que foi historicamente correlacionada com o aparecimento de sinais e sintomas, o efeito em meio de cultura deve sempre ser avaliado em estudos futuros de expressão.

O Capítulo 3 desta tese teve enfoque na DB parcial, forma da doença para qual há controvérsias em relação ao prognóstico, benefícios da triagem e tratamento preventivo.

Em 2015, o *expert* Prof. Barry Wolf publicou sua experiência desde o início da triagem neonatal para DB nos EUA. Em relação à DB parcial, ele reportou que ao longo dos anos foi tomando conhecimento de crianças identificadas por triagem, mas que não foram tratadas, e de crianças não identificadas por triagem e, portanto, que também não foram tratadas, as quais eventualmente desenvolveram sintomas típicos de pacientes com DB total. Com isso, ele passou a recomendar o tratamento com biotina para todas as crianças com DB parcial de modo a evitar os sintomas. Em tal artigo, foram compiladas informações de 20 indivíduos sintomáticos reportados na literatura; além desses, o autor diz ter conhecimentos de mais casos não publicados. Alguns exemplos de sintomas são: *rash*, alopecia, hipotonia, convulsões, atraso no desenvolvimento; apareceram de forma mais branda do que na DB total (Wolf, 2015).

Por outro lado, há profissionais que criticam a triagem neonatal para a forma parcial DB. O principal argumento é que indivíduos com esses níveis de atividade enzimática raramente desenvolvem sintomas; os casos são esporádicos e restritos a situações de estresse (infecções, desnutrição).

Os resultados apresentados no Capítulo 3 sugerem que pacientes com DB parcial não desenvolvem alterações metabólicas relacionadas a déficit energético nos primeiros meses de vida. Apesar dos ácidos orgânicos na urina serem um achado relatado na DB, foram analisados metabólitos detectados no plasma porque esse tipo de amostra foi mais conveniente no momento do recrutamento.

Em relação ao tratamento com biotina (usualmente 5-10 mg por dia, por toda a vida), essencialmente todos os pacientes o toleraram sem efeitos colaterais. Entretanto, pouco se sabe sobre a dose necessária para crianças mais velhas, adolescentes e adultos. Com a manutenção da dose de biotina constante, ocorre uma “titulação”: à medida que o paciente cresce, a dose de biotina por quilograma de peso diminui. A grande maioria dos pacientes permanece assintomática com 10 mg de biotina diária. Conforme relato de experiência clínica do *expert* Prof. Barry Wolf, várias meninas com DB total

desenvolveram perda de cabelo durante a adolescência ou a puberdade que foi resolvida após aumentar as doses de biotina de 10 mg por dia para 15 ou 20 mg por dia. Com base nisso, Wolf recomenda aumentar a dose para pacientes de ambos os sexos nesta fase. Para mulheres grávidas de bebê com DB ou com risco de DB, não há manejo especial, mas deve ser considerada a suplementação com biotina (Wolf, 2015).

14 CONCLUSÕES

As conclusões do trabalho serão apresentadas por objetivo.

I. Identificar as variantes mais frequentes do gene BTB em pacientes brasileiros.

As variantes mais frequentes entre brasileiros com atividade reduzida da biotinidase foram c.1330G>C (p.Asp444His), c.755A>G (p.Asp252Gly) e c.[511G>A;1330G>C] (p.[Ala171Tyr;Asp444His]), com frequências alélicas de 46,7%, 5,8% e 3,6%, respectivamente. Em conjunto, elas representam 56% dos alelos patogênicos encontrados neste estudo. Essas variantes também estão entre as mais frequentes em outros estudos, entretanto, como pode ser percebido pela baixa frequência de cada uma (com exceção da c.1330G>C), existe uma grande heterogeneidade alélica na DB. Neste estudo, ainda foram identificadas três variantes novas: c.1337T>C ou p.Leu446Pro, c.1466A>G ou p.Asn489Ser, e c.962G>A ou p.Trp321*.

II. Verificar a associação entre genótipo e fenótipo bioquímico (classe de atividade da biotinidase) em pacientes brasileiros.

Os dados sugerem que a associação genótipo-fenótipo bioquímico é falha (inconsistente). A concordância entre o fenótipo bioquímico esperado (conforme o genótipo) e fenótipo bioquímico observado (conforme atividade enzimática) ocorreu em aproximadamente 70% dos casos.

III. Examinar a região promotora, 5'UTR e éxon 1 e do gene BTB (regiões comumente não avaliadas) para identificação de variantes que possam estar contribuindo para os níveis de atividade da biotinidase nos pacientes.

A partir da análise dessas regiões, três variantes (polimorfismos) na região promotora foram identificados. As variantes c.-514C>T, c.-315A>G e c.-183G>A foram encontradas em pacientes “discordantes” (quanto ao genótipo e fenótipo), e c.-183G>A e c.-514C>T também estavam presentes em pacientes “concordantes”. Essas variantes parecem não exercer efeito relevante na atividade da biotinidase.

IV. Avaliar fatores não genéticos que possam contribuir para o fenótipo bioquímico, como prematuridade, icterícia e transporte da amostra.

A icterícia neonatal, a prematuridade e transporte da amostra de plasma não parecem ser as principais causas das discordâncias entre os fenótipos bioquímicos esperados e observados em nosso estudo.

V. Avaliar a atividade enzimática em função da idade.

Nossos dados sugerem que a atividade enzimática pode aumentar com a idade, em particular durante o período neonatal, e que a prematuridade e icterícia neonatal podem ter contribuído para os primeiros resultados mais baixos.

VI. Estabelecer critérios para o emprego da análise genética no contexto do diagnóstico da DB.

As discordâncias entre genótipo e fenótipo bioquímico reforçam a orientação de que a DB deve ser diagnosticada com base na medida da atividade biotinidase. Uma vez que esse teste pode ser influenciado por vários fatores, recomendamos realizar mais de uma medida (de preferência no mesmo laboratório), e que pelo menos uma amostra seja coletada após o período neonatal. O resultado de atividade enzimática mais elevada deve ser usado para classificação. A análise genética (do paciente e pais) pode ser útil após a segunda medida da atividade da biotinidase se o resultado for aproximadamente 30% da atividade normal, para obtenção de mais evidências de BD parcial e decisão sobre manutenção do tratamento.

VII. Avaliar a patogenicidade da variante mais frequente (c.1330G>C ou p.Asp444His) e das variantes novas do tipo sentido trocado (c.119T>C ou p.Leu40Pro, c.479G>A ou p.Cys160Tyr, c.664G>A ou p.Asp222Asn, c.1337T>C ou p.Leu446Pro, c.1466A>G ou p.Asn489Ser), identificadas em paciente brasileiros, através de expressão in vitro.

Os resultados deste estudo *in vitro* sugerem que as variantes p.Leu40Pro, p.Cys160Tyr e p.Leu446Pro são deletérias, e que as variantes p.Asp222Asn, p.Asp444His e p.Asn489Ser não são deletérias. Apesar disso, a

variante p.Asn489Ser pode estar associada à DB parcial. A variante p.Asp444His, previamente associada a DB parcial, resultou em atividade alta (100%) em meio de cultura. Especula-se que essa variante esteja relacionada à instabilidade da enzima e relacionada à atividade enzimática variável.

VIII. Realizar avaliação metabólica em indivíduos com DB parcial - através da medida de ácidos graxos, aminoácidos, colesterol total, triglicerídeos, glicose e insulina em amostras de plasma - na busca de biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico e prognóstico (evidências de patogenicidade da DB parcial).

Os resultados sugerem que indivíduos assintomáticos com atividade da biotinidase entre 10-30% (identificados por triagem neonatal) não apresentam descompensação bioquímica nos primeiros meses de vida sem tratamento. O estudo não demonstrou evidências que reforcem o caráter patogênico da DB parcial e, por consequência, a necessidade de triagem neonatal e tratamento preventivo.

15 PERSPECTIVAS

Como continuidade dessa pesquisa, os seguintes estudos estão sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa:

- Pesquisa de alterações na região 3'UTR do gene *BTD*, especialmente nos pacientes sem variantes patogênicas identificadas e com genótipo discordante do fenótipo bioquímico.

- Avaliação epigenética, por estudo da metilação do gene *BTD*, principalmente naqueles indivíduos com mesmo genótipo que apresentam fenótipos bioquímicos distintos.

Além disso, projetos podem ser delineados para analisarem os seguintes aspectos, por exemplo:

- Avaliação da estabilidade da enzima com a variante p.Asp444His (em plasma de indivíduos homozigotos ou a partir de expressão *in vitro*) frente a diferentes temperaturas e tempos de incubação pré-ensaio da atividade enzimática.

- Estabelecimento de intervalos de referência para a atividade da biotinidase para as diferentes classes - DB total, DB parcial, heterozigotos e normal - para crianças no período neonatal e pós-neonatal, com confirmação da classe com teste genético em paralelo.

- Estabelecimento da idade para realização do teste confirmatório de atividade enzimática.

- Revisão sistemática da literatura a respeito de evidências terapêuticas para a DB parcial.

16 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. doi: 10.1038/nmeth0410-248
- Al-Jasmi FA, Al-Shamsi A, Hertecant JL, Al-Hamad SM, Souid A-K (2015) Inborn Errors of Metabolism in the United Arab Emirates: Disorders Detected by Newborn Screening (2011-2014). *JIMD Rep.* doi: 10.1007/8904_2015_512
- Asgari A, Rouhi Dehnabeh S, Zargari M, Khani S, Mozafari H, Varasteh A, Keyfi F, Barzegari M, Hasanzaeh R, Khatami S (2016) Clinical, Biochemical and Genetic Analysis of Biotinidase Deficiency in Iranian Population. *Arch Iran Med* 19:774–778. doi: 0161911/AIM.006
- 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, Berghe G van den, Walter JH (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:e13-6. doi: 10.1590/S0325-00752010000100017
- 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 Inherit Metab Dis* 28:903–912. doi: 10.1007/s10545-005-0161-3
- Bendl J, Musil M, Stourac J, Zendulka J, Damborsky J, Brezovsky J (2016) PredictSNP2: A Unified Platform for Accurately Evaluating SNP Effects by Exploiting the Different Characteristics of Variants in Distinct Genomic Regions. *PLoS Comput Biol* 12:e1004962. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004962
- Betts MJ, Russell RB (2007) Amino-acid properties and consequences of

- substitutions. In: Barnes M (ed) *Bioinformatics for Geneticists*, 2nd edn. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, pp 311–342
- Bogusiewicz A, Horvath TD, Stratton SL, Mock DM, Boysen G (2012) Measurement of acylcarnitine substrate to product ratios specific to biotin-dependent carboxylases offers a combination of indicators of biotin status in humans. *J Nutr* 142:1621–1625. doi: 10.3945/jn.112.164814
- Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Lima SE, S. Carvalho MR, S. Fonseca PA, S. Camelo J, M. Ribeiro E, F. V. de Medeiros P, M. Lourenço C, F. M. de Souza C, *et al* (2017) Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. *PLoS One* 12:e0177503. doi: 10.1371/journal.pone.0177503
- Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Pinto LLC, Luca GR De, Carvalho FL, Souza CFM De, Medeiros PFV De, Lourenco CM, Filho RLO, Neto EC, *et al* (2014) Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 Brazilian patients. *BMC Med Genet* 15:96. doi: doi:10.1186/s12881-014-0096-3
- Carney AE, Sanders RD, Garza KR, McGaha LA, Bean LJH, Coffee BW, Thomas JW, Cutler DJ, Kurtkaya NL, Fridovich-Keil JL (2009) Origins, distribution and expression of the Duarte-2 (D2) allele of galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Hum Mol Genet* 18:1624–1632. doi: 10.1093/hmg/ddp080
- 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. In: *The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, 3^a. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 331–344
- CONITEC (2017) *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Deficiência de Biotinidase*. Ministério da Saúde, Brasília
- Cowan TM, Blitzer MG, Wolf B (2010) Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency. *Genet Med* 12:464–70. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181e4cc0f
- Craft D V, Goss NH, Chandramouli N, Wood HG (1985) Purification of biotinidase from human plasma and its activity on biotinyl peptides.

- Biochemistry 24:2471–2476. doi: 10.1021/bi00331a012
- 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. doi: 10.1126/science.92.2384.224
- Ezgu F (2016) Inborn Errors of Metabolism. Adv Clin Chem 73:195–250. doi: 10.1016/bs.acc.2015.12.001
- Gannavarapu S, Prasad C, DiRaimo J, Napier M, Goobie S, Potter M, Chakraborty P, Karaceper M, Munoz T, Schulze A, *et al* (2015) Biotinidase deficiency: Spectrum of molecular, enzymatic and clinical information from newborn screening Ontario, Canada (2007-2014). Mol Genet Metab 116:146–151. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.08.010
- 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. doi: 10.1126/science.93.2420.477
- 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, McVoy JR, Napolitano A, Mitchell PL, Lambert FW, Linyear AS (1986) Neonatal screening for biotinidase deficiency: results of a 1-year pilot study. J Pediatr 108:40–6
- Hernandez-Vazquez A, Ochoa-Ruiz E, Ibarra-Gonzalez I, Ortega-Cuellar D, Salvador-Adriano A, Velazquez-Arellano A (2012) Temporal development of genetic and metabolic effects of biotin deprivation. A search for the optimum time to study a vitamin deficiency. Mol Genet Metab 107:345–351. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.09.005
- 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 BTD causing biotinidase deficiency. Hum Mutat 18:375–381. doi: 10.1002/humu.1208
- Hymes J, Wolf B (1999a) Human biotinidase isn't just for recycling biotin. J Nutr 129:485S–489S
- Hymes J, Wolf B (1996) Biotinidase and its roles in biotin metabolism. Clin Chim

- Acta 255:1–11. doi: 10.1016/0009-8981(96)06396-6
- Hymes J, Wolf B (1999b) Symposium: Nutrition, Biochemistry and Molecular Biology of Biotin, Human Biotinidase Isn't Just for Recycling Biotin. *Am Soc Nutr Sci* 485–489
- Iqbal F, Item CB, Vilaseca MA, Jalan A, Mühl A, Couce ML, Duat A, Delgado MP, Bosch J, Puche A, *et al* (2010) The identification of novel mutations in the biotinidase gene using denaturing high pressure liquid chromatography (dHPLC). *Mol Genet Metab* 100:42–45. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.12.016
- Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, Guturu H, Stenson PD, Cooper DN, Bernstein JA, Bejerano G (2016) M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nat Genet* 48:1581–1586. doi: 10.1038/ng.3703
- Jay AM, Conway RL, Feldman GL, Nahhas F, Spencer L, Wolf B (2015) Outcomes of individuals with profound and partial biotinidase deficiency ascertained by newborn screening in Michigan over 25 years. *Genet Med* 17:205–209. doi: 10.1038/gim.2014.104
- Jayaprakash NG, Surolia A (2017) Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability. *Biochem J* 474:2333–2347. doi: 10.1042/BCJ20170111
- Karaca M, Özgül RK, Ünal Ö, Yücel-Yılmaz D, Kılıç M, Hişmi B, Tokatlı A, Coşkun T, Dursun A, Sivri HS (2015) Detection of biotinidase gene mutations in Turkish patients ascertained by newborn and family screening. *Eur J Pediatr* 174:1077–1084. doi: 10.1007/s00431-015-2509-5
- Knight HC, Reynolds TR, Meyers GA, Pomponio RJ, Buck GA, Wolf B (1998) Structure of the human biotinidase gene. *Mamm Genome* 9:327–330. doi: 10.1007/s003359900760
- 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. doi: 10.1038/nprot.2009.86
- 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
- Kuroishi T, Rios-Avila L, Pestinger V, Wijeratne SSK, Zemleni J (2011)

- Biotinylation is a natural, albeit rare, modification of human histones. *Mol Genet Metab* 104:537–545. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.08.030
- Lara MT, Gurgel-Giannetti J, Aguiar MJB, Ladeira RVP, Carvalho NO, Del Castillo DM, Viana MB, Januario JN (2015) High Incidence of Biotinidase Deficiency from a Pilot Newborn Screening Study in Minas Gerais, Brazil. *JIMD Rep*. doi: 10.1007/8904_2015_447
- Lek M, Karczewski K, Minikel E, Samocha K, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria A, Ware J, Hill A, Cummings B, *et al* (2015) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *bioRxiv*
- Li H, Spencer L, Nahhas F, Miller J, Fribley A, Feldman G, Conway R, Wolf B (2014) Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by newborn screening in Michigan including an unique intronic mutation that alters mRNA expression of the biotinidase gene. *Mol Genet Metab* 112:242–246. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.04.002
- 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 G dos S, Carvalho MD de B, 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 M a, Ebers DD, Hart PS, Pettit DD, Blitzer MG, Wolf B (1990) Partial biotinidase deficiency: clinical and biochemical features. *J Pediatr* 116:78–83. doi: 10.1016/S0022-3476(05)81649-X
- Milankovics I, Kamory E, Csokay B, Fodor F, Somogyi C, Schuler A (2007) Mutations causing biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in Western Hungary. *Mol Genet Metab* 90:345–348. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.11.005
- Milánkovics I, Németh K, Somogyi C, Schuler Á, Fekete G (2010) High frequencies of biotinidase (BTD) gene mutations in the Hungarian population. *J Inherit Metab Dis* 33:. doi: 10.1007/s10545-010-9152-0
- Möslinger D, Mühl A, Suormala T, Baumgartner R, Stöckler-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:S46-9. doi: 10.1007/s00431-003-1351-3
- 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. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200620
- Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, Bozoklian D, Sandberg TOM, Brito LA, Lazar M, *et al* (2017) Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat* 38:751–763. doi: 10.1002/humu.23220
- National Research Council (1998) Biotin. In: National Academy of Sciences (ed) *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. The National Academies Press, Washington, DC, pp 374–389
- Neto EC, Schulte J, Rubim R, Lewis E, DeMari J, Castilhos C, Brites A, Glugliani R, Jensen KP, Wolf B (2004) Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: Biochemical and molecular characterizations. *Brazilian J Med Biol Res* 37:295–299. doi: 10.1590/S0100-879X2004000300001
- Norrgard KJ, Hymes J, Wolf B (2000) Examination of the Signal Peptide Region of Human Biotinidase Using a Baculovirus Expression System. *Mol Genet Metab* 69:56–63. doi: 10.1006/mgme.1999.2951
- 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. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:5<410::AID-HUMU10>3.0.CO;2-8
- Norrgard KJ, Pomponio RJ, Swango KL, Hymes J, Reynolds TR, Buck G a, Wolf B (1997) Mutation (Q456H) is the most common cause of profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in the

- United States. *Biochem Mol Med* 61:22–7. doi: 10.1006/bmme.1997.2597
- Oizumi J, Hayakawa K, Hosoya M (1989) Comparative study on human milk and serum biotinidase. *Biochimie* 71:1163–1169
- Perlman D, Halvorson HO (1983) A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J Mol Biol* 167:391–409
- Pindolia K, Jensen K, Wolf B (2007) Three dimensional structure of human biotinidase: Computer modeling and functional correlations. *Mol Genet Metab* 92:13–22. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.04.013
- Pindolia K, Jordan M, Wolf B (2010) Analysis of mutations causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat* 31:983–991. doi: 10.1002/humu.21303
- 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 J V, Nicholl J, Nicholson P, Tunaley JR, Viridi 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, *et al* (1998) Prenatal diagnosis of heterozygosity for biotinidase deficiency by enzymatic and molecular analyses. *Prenat Diagn* 18:117–122
- Pomponio RJ, Norrgard KJ, Hymes J, Reynolds TR, Buck GA, Baumgartner R, Suormala T, Wolf B (1997) Arg538 to Cys mutation in a CpG dinucleotide of the human biotinidase gene is the second most common cause of profound biotinidase deficiency in symptomatic children. *Hum Genet* 99:506–512. doi: 10.1007/s004390050397
- Pomponio RJ, Ozand PT, Al Essa M, Wolf B (2000b) Novel mutations in children with profound biotinidase deficiency from Saudi Arabia. *J Inherit Metab Dis* 23:185–187
- Porta F, Pagliardini V, Celestino I, Pavanello E, Pagliardini S, Guardamagna O, Ponzzone A, Spada M (2017) Neonatal screening for biotinidase deficiency:

- A 30-year single center experience. *Mol. Genet. Metab. Reports* 13:80–82
- Procter M, Wolf B, Crockett DK, Mao R (2013) The Biotinidase Gene Variants Registry: A Paradigm Public Database. *G3 (Bethesda)* 3:727–731. doi: 10.1534/g3.113.005835
- 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. *Ophthalmol J Int d'ophtalmologie Int J Ophthalmol Zeitschrift fur Augenheilkd* 206:177–181
- Schulpis KH, Gavriili S, Tjamouranis J, Karikas GA, Kapiki A, Costalos C (2003) The effect of neonatal jaundice on biotinidase activity. *Early Hum Dev* 72:15–24. doi: 10.1016/S0378-3782(02)00097-X
- 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
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Meth* 11:361–362
- Senanayake DN, Jasinge EA, Pindolia K, Wanigasinghe J, Monaghan K, Suchy SF, Wei S, Jaysena S, Wolf B (2017) Corrigendum to “First contiguous gene deletion causing biotinidase deficiency: The enzyme deficiency in three Sri Lankan children” [*Mol. Genet. Metab. Rep.* 2 (2016) 81–84]((S2214426915000075)(10.1016/j.ymgmr.2015.01.005)). *Mol Genet Metab Reports* 11:95. doi: 10.1016/j.ymgmr.2016.04.001
- Singh A, Lomash A, Pandey S, Kapoor S (2015) Clinical, Biochemical and Outcome Profile of Biotinidase Deficient Patients from Tertiary Centre in Northern India. *J Clin Diagn Res* 9:SC08-10. doi: 10.7860/JCDR/2015/12958.6941
- Sivri H, Genc G, Tokatli A, Dursun A, Cothkun T, Aydyn H, Sennarolu L, Belggn E, Jensen K, Wolf B (2007) Hearing Loss in Biotinidase Deficiency: Genotype-Phenotype Correlation. *J Pediatr* 150:439–442. doi: 10.1016/j.jpeds.2007.01.036

- 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. doi: 10.1016/j.ymgme.2003.12.006
- Strovel ET, Cowan TM, Scott AI, Wolf B (2017) Laboratory diagnosis of biotinidase deficiency, 2017 update: a technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. doi: 10.1038/gim.2017.84
- 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, Hüner G, Pronicka E, Sykut-Cegielska J, Schulze A, Wolf B (1998) Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene. *Hum Genet* 102:571–575. doi: 10.1007/s004390050742
- Szymanska E, Sredzinska M, Lugowska A, Pajdowska M, Rokicki D, Tyłki-Szymanska A (2015) Outcomes of oral biotin treatment in patients with biotinidase deficiency - Twenty years follow-up. *Mol Genet Metab reports* 5:33–35. doi: 10.1016/j.ymgmr.2015.09.004
- Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, Kneisser I, Saadallah A, Borrajo GJC, Adams J (2015) Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinatol* 39:171–187. doi: 10.1053/j.semperi.2015.03.002
- Thibodeau D, Andrews W, Meyer J, Mitchell P, Wolf B (1993) Comparison of the effects of season and prematurity on the newborn screening test for galactosemia and biotinidase deficiency. *Screening* 2:19–27
- Thodi G, Schulpis KH, Hatzidaki M, Molou E, Triantafylli O, Dotsikas Y, Loukas YL (2016) Partial biotinidase deficiency: identification of a single novel mutation (p.H314R) in a Greek newborn. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 29:389–390
- 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. doi: 10.1016/j.gene.2013.04.059
- Tong L (2013) Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell*.

- Mol. Life Sci. 70:863–891
- Vairo F, Souza CFM de (2013) Genética Médica. In: Deitos D (ed) Clínica médica: consulta rápida, 4^a. Artmed, Porto Alegre, pp 309–334
- Vincenz-Donnelly L, Hipp MS (2017) The endoplasmic reticulum: A hub of protein quality control in health and disease. *Free Radic Biol Med* 108:383–393. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.031
- 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
- Weiner DL (2017) Inborn Errors of Metabolism: Practice Essentials, Pathophysiology, Etiology. <https://emedicine.medscape.com/article/804757-overview>. Accessed 20 Feb 2018
- Wiltink RC, Kruijshaar ME, Van Minkelen R, Onkenhout W, Verheijen FW, Kemper EA, Van Spronsen FJ, Van Der Ploeg AT, Niezen-Koning KE, Saris JJ, *et al* (2016) Neonatal screening for profound biotinidase deficiency in the Netherlands: consequences and considerations. *Eur J Hum Genet* 24:1424–1429. doi: 10.1038/ejhg.2016.65
- Wolf B (1991) Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 14:923–927. doi: 10.1007/BF01800475
- Wolf B (2003) Biotinidase Deficiency: New Directions and Practical Concerns. *Curr Treat Options Neurol* 5:321–328. doi: 10.1007/s11940-003-0038-4
- Wolf B (2016a) Biotinidase Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, *et al.* (eds) GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle
- 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. doi: 10.1038/gim.2011.6
- Wolf B (2016b) First microdeletion involving only the biotinidase gene that can cause biotinidase deficiency: A lesson for clinical practice. *Mol Genet Metab reports* 6:74–76. doi: 10.1016/j.ymgmr.2016.02.006
- Wolf B (2010) Clinical issues and frequent questions about biotinidase

- deficiency. *Mol Genet Metab* 100:6–13. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.01.003
- Wolf B (2016c) Successful outcomes of older adolescents and adults with profound biotinidase deficiency identified by newborn screening. *Genet Med* 1–7. doi: 10.1038/gim.2016.135
- Wolf B (2015) Why screen newborns for profound and partial biotinidase deficiency? *Mol Genet Metab* 114:382–387. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.01.003
- Wolf B, Feldman GL (1982) The biotin-dependent carboxylase deficiencies. *Am J Hum Genet* 34:699–716
- 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 (1983b) Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* 131:273–281. doi: 10.1016/0009-8981(83)90096-7
- Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL, Parker WD, Howell DM, Hurst DL (1983c) Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *J Pediatr* 103:233–237
- Wolf B, Jensen K (2005) Evolutionary conservation of biotinidase: Implications for the enzyme's structure and subcellular localization. *Mol Genet Metab* 86:44–50. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.07.011
- Wolf B, Jensen K, Huner G, Demirkol M, Baykal T, Divry P, Rolland M-O, Perez-Cerda C, Ugarte M, Strausberg R, *et al* (2002a) Seventeen novel mutations that cause profound biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 77:108–111
- 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, *et al* (1998) Delayed-onset profound biotinidase deficiency. *J Pediatr* 132:362–5. doi: S0022347698000523 [pii]
- 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. doi: 10.1067/mpd.2002.121938
- Wongkittichote P, Ah Mew N, Chapman KA (2017) Propionyl-CoA carboxylase – A review. *Mol Genet Metab* 122:145–152. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.10.002>
- 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:. doi: 10.1007/s10545-009-1238-1
- Zempleni J, Mock DM (2000) Utilization of biotin in proliferating human lymphocytes. *J Nutr* 130:335S–337S

17 ANEXOS

17.1 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

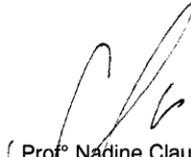
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

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

17.2 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: 140710

Data da Versão do Projeto: 24/12/2014

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

TACIANE BORSATTO

SAMYRA ESPINDOLA LIMA

FERNANDA SPERB LUDWIG

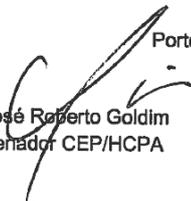
Título: Abordagem inédita na avaliação genética de brasileiros com deficiência de
biotinidase: análise do promotor e éxon 1 do gene BTB

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, 02 de março de 2015.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

17.3 Anexo III



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: 140401

Data da Versão do Projeto: 21/07/2014

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

RENATA VOLTOLINI VELHO

TACIANE BORSATTO

FERNANDA SPERB LUDWIG

Título: Estudo de expressão de variantes do gene *BTB*

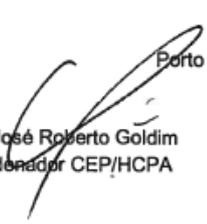
Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

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, 25 de agosto de 2014.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

17.4 Anexo IV



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: 160072

Data da Versão do Projeto: 12/02/2016

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

TACIANE BORSATTO

Título: Avaliação metabólica em indivíduos com níveis reduzidos de atividade da biotinidase

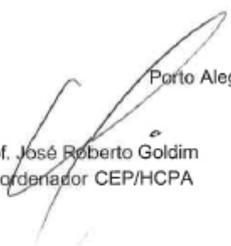
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

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, 17 de novembro de 2016.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

18 APÊNDICES

18.1 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

Nº: _____

Sexo: () fem () masc

Data de nascimento: ___ / ___ / _____

Idade: _____

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

Consanguinidade entre os pais: () sim () não

Médico assistente – Contato:

Dr. _____

Instituição: _____

Cidade: _____ UF: _____

Rua: _____ Nº _____ compl. _____

CEP: _____

Telefone: () _____ E-mail: _____

Informações Clínicas

Diagnosticado por: () triagem neonatal

() rastreamento familiar

() suspeita clínica

Complete o quadro com todos os testes de atividade da biotinidase que foram realizados (triagem e confirmatório):

Data	Laboratório	Amostra (papel filtro, soro/plasma, outro?)	Método	Resultado (e unidade de medida)	Intervalo de referência (e média da atividade normal, se disponível)
.....					
.....					
Paciente					
.....					
.....					

Pai					
Mãe					

Prematuridade: () sim, semanas gestacionais:_____ () não

Relato de icterícia: () sim () não

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

Quem: _____

Tratamento com biotina: () não () sim

Dose (atual): _____mg/dia

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

() Hipotonia

() Atraso motor

() Regressão motora

() Fraqueza muscular motora

() Ptose

() Paresia espástica

() Ataxia

() Letargia

() Convulsões

() Retardo mental

() Coma

() Alteração no eletroencefalograma

() Alteração na ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada do cérebro

() Alteração da mielografia

() Atraso na fala

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
- Hiperamonemia

Problemas Cutâneos

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

Outros

- Infecção do trato urinário
- Conjuntivite subclínica
- Problema gastrointestinal

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:

18.2 Apêndice II

Produções complementares

Os trabalhos aqui apresentados foram publicados na forma de resumos, e apresentados na forma de pôster nos seguintes eventos:

XI Latin American School of Human and Medical Genetics (ELAG),

XXVII Congresso Brasileiro de Genética Médica,

35ª Semana Científica HCPA,

Salão de Iniciação Científica da UFRGS (2016),

X Latin American Congress of Inborn Errors of Metabolism and Neonatal Screening,

SSIEM 2016 Annual Symposium,

13th International Congress of Inborn Errors of Metabolism.

Além disso, a doutoranda coorientou trabalho de conclusão de curso de graduação, e participou como coautora nos trabalhos:

“CBS mutations are good predictors for B6-responsiveness: A study based on the analysis of 35 Brazilian Classical Homocystinuria patients” (Mol Genet Genomic Med. 2017;1–12), e

“Diagnosis and management of classical homocystinuria in Brazil: A summary of 72 late diagnosed patients” (em processo de submissão).

Atualmente, colabora com projetos de mestrado sobre deficiência de biotinidase.