

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

TRIAGEM NEONATAL
PARA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE
NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Marilis Tissot Lara

Belo Horizonte
2010

Marilis Tissot Lara

**TRIAGEM NEONATAL
PARA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE
NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Juliana Gurgel Giannetti.

Coorientador: Prof. Dr. José Marcos Burle de Aguiar.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Ronaldo Tadêu Pena

Vice-Reitora: Prof^ª. Heloísa Maria Murgel Starling

Pró-Reitora de Pós-Graduação: Prof^ª. Elizabeth Ribeiro da Silva

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Carlos Faria Santos Amaral

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: João Lúcio dos Santos Jr.

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^ª. Maria Aparecida Martins

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente

Coordenador: Prof. Joel Alves Lamounier

Subcoordenadora: Prof^ª. Ana Cristina Simões e Silva

Colegiado:

Prof^ª. Ivani Novato Silva

Prof. Jorge Andrade Pinto

Prof^ª. Lúcia Maria Horta Figueiredo Goulart

Prof^ª. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Prof. Marco Antônio Duarte

Prof^ª. Regina Lunardi Rocha

Gustavo Sena Sousa (Repr. Discente)

Aos meus familiares,
em especial ao meu filho, Thalles,
e a meu marido, José Edson.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela oportunidade de mais esta realização.

Em especial, à minha orientadora, Professora Juliana Gurgel Giannetti, pela confiança no meu trabalho, incentivo constante e colaboração permanente, exemplo de determinação e, principalmente, pela grande amizade.

Ao meu coorientador, Professor Marcos José Burle de Aguiar, pelo incentivo e valiosa colaboração.

Ao Professor José Nélio Januário, diretor do NUPAD/FM/UFMG, pela valiosa colaboração e atenção.

Ao Roberto Vagner Púglia Ladeira, responsável pelo laboratório de triagem neonatal do NUPAD/FM/UFMG, pela colaboração e, principalmente, pelos esclarecimentos das dúvidas e atenção constante.

A Bruna, Silvânia, Ivan, Rejane, Jarilda, David, Jaqueline e a todos os funcionários do NUPAD/FM/UFMG, que não pouparam esforços na ajuda neste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente, das disciplinas por mim cursadas, pela significativa contribuição científica.

Aos colegas e amigos do mestrado, por tornar mais agradável a caminhada.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente, pela atenção, em especial às secretárias Mari e Élen.

Às secretárias e técnicas do setor de Neurofisiologia do HC-UFMG, pela contribuição na realização dos eletroencefalogramas dos pacientes desta pesquisa, em especial a Vilma e Ivonilda.

Às minhas grandes amigas, Cláudia e Maria Juliana, da residência de Neuropediatria do HC-UFMG, pelo apoio, incentivo, contribuição nos momentos em que necessitei estar ausente.

Aos funcionários do Ambulatório São Vicente do HC-UFMG, pelo carinho e atenção.

À bibliotecária Mariza, da UFMG, pela marcante contribuição no trabalho de revisão bibliográfica.

À professora Emilia Sakurai, da disciplina de Bioestatística, pós-graduação da UFMG; e Grazielli, monitora do Núcleo de Bioestatística, pela ajuda na análise estatística e construção dos gráficos.

Ao NUPAD/FM/UFMG, que proporcionou o apoio logístico e financeiro que permitiu a realização desta pesquisa.

À professora Magda Barbosa Roquete Taranto, pela revisão de português deste trabalho e pela atenção dispensada.

Aos meus pais, pela educação, carinho, exemplos de força e de coragem.

Ao meu marido, José Edson, pelo amor, incentivo, compreensão e colaboração constantes.

Ao meu filho, Thalles, pelo carinho, amor e compreensão.

Aos pais dos pacientes e às crianças que foram avaliadas nesta pesquisa, sem os quais seria inviável a realização deste trabalho.

**“A mente que se abre para uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”**

Albert Einstein.

NOTA EXPLICATIVA

Seguindo os critérios estabelecidos pelo Colegiado de Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (FM-UFMG), esta dissertação foi apresentada no formato de artigos científicos, contendo um artigo de revisão e outro original. Apesar de recomendada, ainda não foi estabelecida uma normatização interna para apresentação neste formato de tese. Desta forma, utilizou-se como referência Souza (2008) e França (2007).

Com o intuito de facilitar a leitura, optou-se por manter um item referente a métodos (APÊNDICE A), que conterà informações detalhadas sobre o teste de triagem qualitativa utilizado no presente estudo, bem como dados referentes ao programa de triagem neonatal de Minas Gerais.

Ressalta-se, ainda, que, por tratar-se de uma dissertação de mestrado, os artigos estão extensos e usou-se o mesmo padrão de referência bibliográfica, para manter a homogeneidade do trabalho. No futuro, quando os artigos forem enviados às revistas científicas, serão feitas adaptações necessárias e a tradução para o inglês.

Assim, sua estrutura foi estabelecida de acordo com o esquema:

1 Considerações iniciais

2 Objetivos

3 Artigo I: Deficiência de biotinidase: aspectos bioquímicos, clínicos, genéticos e a triagem neonatal: uma revisão da literatura (artigo de revisão)

4 Artigo II: Triagem neonatal para deficiência de biotinidase no estado de Minas Gerais (artigo original)

5 Considerações finais

Referências

Anexos e Apêndices

RESUMO

Triagem neonatal para deficiência de biotinidase no estado de Minas Gerais

Introdução: a deficiência de biotinidase é uma doença metabólica hereditária, com herança autossômica recessiva, causada por mutações no gene biotinidase (BTD), localizado no braço curto do cromossomo 3(3p25). Geralmente essa doença manifesta-se por meio de distúrbios neurológicos e cutâneos. O diagnóstico consiste na detecção da atividade da enzima biotinidase no plasma, a partir da qual os pacientes são classificados em dois subgrupos: deficiência total ou parcial, na qual a atividade enzimática encontra-se, respectivamente, abaixo de 10% ou entre 10 e 30% da atividade média normal. Estudos de prevalência da deficiência de biotinidase em alguns países mostram taxas que variam de 1:40.000 a 1:60.000. No Brasil, existem poucas pesquisas sobre sua prevalência e há discordância nos resultados encontrados. O objetivo principal deste trabalho foi estimar a prevalência da deficiência de biotinidase no estado de Minas Gerais, com base no teste de triagem realizado em amostras de sangue seco coletadas do calcanhar de recém-nascidos avaliados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal. **Material e métodos:** realizou-se estudo transversal no período de nove meses, de setembro de 2007 a junho de 2008. Foi utilizada parte do sangue dos recém-nascidos, coletada em papel-filtro e enviada ao NUPAD/FM-UFMG, para realização dos exames de triagem neonatal. A triagem foi feita pelo método qualitativo colorimétrico visual UMTEST BIOTINIDASA, desenvolvido em Cuba, e confirmado por dosagem quantitativa de biotinidase. Os pacientes com deficiência de biotinidase confirmada foram submetidos à avaliação clínica e neurológica antes e após o início do tratamento, com biotina 10 mg, via oral, diariamente. **Resultados:** foram triadas 182.942 amostras, em duplicata, de sangue seco de recém-nascidos, em papel filtro, das quais 1.039 mostraram-se alteradas. Um segundo exame de triagem foi realizado e resultou em 129 amostras suspeitas de deficiência de biotinidase. Destes recém-nascidos, 120 retornaram e foram coletadas amostras para o estudo quantitativo, que confirmou o diagnóstico de deficiência parcial de biotinidase em 10 casos com igual distribuição entre os sexos. Não foram identificados casos de deficiência total de biotinidase. Todos os pacientes apresentavam avaliação clínica e neurológica normais antes e após o início do tratamento. A prevalência de deficiência de biotinidase da população estudada foi de 1:18.289 nascidos vivos. O teste colorimétrico visual foi considerado efetivo em identificar os casos de deficiência de biotinidase e apresentou sensibilidade relativa de 100%, especificidade de 99,94%, falso-positivos de 0,06% e valor preditivo positivo de 8,3%. **Conclusão:** o presente estudo revelou prevalência de deficiência de biotinidase de 1:18.289 nascidos vivos no estado de Minas Gerais, no período de setembro de 2007 a junho de 2008. Essa prevalência mostrou-se mais alta que a encontrada em outros países. Ressalta-se que todos os casos identificados foram classificados como forma de deficiência parcial de biotinidase.

Palavras-chave: Deficiência de biotinidase. Triagem neonatal. Biotina. Biotinidase. Deficiência múltipla de carboxilases.

ABSTRACT

Neonatal screening for biotinidase deficiency in the state of Minas Gerais

Introduction: biotinidase deficiency is an inherited metabolic disorder, autosomal, recessive, caused by gene mutations in the biotinidase (BTD), located in chromosome 3p25. Usually this disorder is manifested through neurological and cutaneous abnormalities. The diagnosis consists in detection of the biotinidase enzyme activity in the plasma, when the patients are classified into two subgroups: profound or partial deficiency, when the enzymatic activity is, respectively, below 10% or between 10 and 30% of the mean normal activity. Studies on the prevalence of biotinidase deficiency in some countries show rates that vary from 1:40.000 to 1:60.000. In Brazil, there are few researches about its prevalence and disagreement on the found results. This paper main objective was to determine the prevalence of the biotinidase deficiency in the state of Minas Gerais, based on the screening test performed with dry blood samples collected from newborn heels evaluated by the Newborn Screening State Program / Programa Estadual de Triagem Neonatal. **Material and methods:** cross-sectional study carried out in the period from September 2007 to June 2008. Part of the newborn blood samples was collected on filter paper and sent to the NUPAD/FM-UFGM, for the newborn screening tests. The screening was done by the visual colorimetric qualitative method UMTEST BIOTINIDASA, developed in Cuba, and confirmed by quantitative dosage of biotinidase. The patients with confirmed biotinidase deficiency underwent clinical and neurological evaluation before and after beginning the treatment with biotina 10 mg, oral via, daily. **Results:** 182.942 newborn's dry blood samples in duplicate were screened, from which 1.039 showed alterations. A second screening test was performed and 129 suspected samples were found for biotinidase deficiency. Among these, 120 newborns returned and samples were collected for the quantitative study that confirmed the partial biotinidase diagnosis in 10 cases with equal distribution between sexes. There was no identification of profound biotinidase deficiency cases. All patients had normal clinical and neurological evaluation before and after the treatment beginning. The prevalence of biotinidase deficiency in the studied population was 1:18.289 live births. The visual colorimetric test was considered effective to identify the biotinidase deficiency cases and showed 100% relative sensitivity, 99,94% specific, 0,06% false positive and 8,3% positive predictive value. **Conclusion:** this study revealed prevalence of biotinidase deficiency of 1:18.289 live births in the State of Minas Gerais, from September 2007 to June 2008. This prevalence proved to be higher than the findings in other countries. It is noteworthy that all the identified cases were classified as partial biotinidase deficiency.

Keywords: Biotinidase deficiency. Newborn screening. Biotina. Biotinidase. Carboxilases multiple deficiency.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
B	Branca
B-PABA	Biotin-ácido p-aminobenzoico
BT	Bilirrubina total
BTD	Biotinidase
C	Colorimétrico
Co	Combinada
C/R	Coleta/recebimento
DB	Deficiência de biotinidase
DC	Diagnóstico confirmado
DMC	Deficiência múltipla de carboxilases
DN	Dia do nascimento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
DPB	Deficiência parcial de biotinidase
DTB	Deficiência total de biotinidase
E	Enzimático
EEG	Eletroencefalograma
EIM	Erros inatos do metabolismo
EUA	Estados Unidos da América
F	Fluorimétrico
FAE	Fármaco antiepiléptico
FM	Faculdade de Medicina
Hc	Hospital das Clínicas
HCS	Holocarboxilase sintetase
IC	Intervalo de confiança
IG	Idade gestacional
Interp	Interpretação
ISNS	Sociedade Internacional para Triagem Neonatal
Km	Constante de Michaelis-Menten

Lab.	Laboratório
LILACS	Centro Latino Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde
MS	Ministério da Saúde
N	Negra
Na+	Sódio
Nd	Nenhum dado
NR	Não referido
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
NV	Nascido vivo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PABA	p-aminobenzoico
Pac	Paciente
PC	Ponto de corte
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PETN	Programa Estadual de Triagem Neonatal
PF	Papel-filtro
pH	Potencial de Hidrogênio
PIG	Pequeno para a idade gestacional
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PO	Programa obrigatório
PP	Programa-piloto
PTN	Programa de Triagem Neonatal
QI	Coefficiente intelectual
Rc/Rs	Recebimento/resultado
RN	Recém-nascido
RNM	Ressonância magnética
SAS	Secretaria de Assistência à Saúde
SBTN	Sociedade Brasileira de Triagem Neonatal
SCIELO	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
SES	Secretaria de Estado da Saúde
SINASC	Sistema de Informações de Nascidos Vivos
SMVT	<i>Sodium-dependent Mult-Vitam Transporter</i>
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>

SRTN	Serviço de Referência em Triagem Neonatal
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ácido tricloroacético
TCG	Tônico-clônico-generalizada
TR	Taxa de reconvocação
Tto	Tratamento
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
W	Método de Wolf

SUMÁRIO¹

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo do artigo I.....	18
2.2 Objetivos do artigo II.....	18
2.2.1 Objetivo geral.....	18
2.2.2 Objetivos específicos.....	18
3 ARTIGO I - DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE: ASPECTOS BIOQUÍMICOS, CLÍNICOS, GENÉTICOS E A TRIAGEM NEONATAL (ARTIGO DE REVISÃO).....	19
4 ARTIGO II - TRIAGEM NEONATAL PARA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE NO ESTADO DE MINAS GERAIS (ARTIGO ORIGINAL).....	56
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICES E ANEXOS.....	85

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Em 1960, o diagnóstico precoce da fenilcetonúria tornou-se realidade a partir do trabalho pioneiro do biólogo Robert Guhtrie, nos Estados Unidos da América (EUA), que desenvolveu um método que permitia determinar a concentração de fenilalanina em amostra de sangue seco coletada em papel-filtro (PF) de recém-nascidos (RNs). Desde então, um passo importante foi dado para a detecção precoce de várias doenças (metabólicas, genéticas, infecciosas, etc.) em grandes populações de RNs, culminando com a criação dos programas de triagem neonatal (PTN), que têm várias diretrizes e objetivos além do simples diagnóstico (DHONDT, 2007). Desta forma, a implantação dos PTNs constituiu importante medida de saúde pública, principalmente na abordagem de alguns erros inatos do metabolismo (EIM) e outras doenças cujos diagnóstico e tratamento precoce podem evitar a instalação de sequelas graves como o retardo mental, tendo como exemplos clássicos a fenilcetonúria e o hipotireoidismo.

As doenças incluídas nos PTNs variam muito entre os vários países e as diversas regiões do mundo. Desde os critérios formulados por Wilson e Jungner, em 1968, para a inclusão de uma doença na triagem neonatal, que posteriormente foram adotados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (ANEXO A), várias interpretações vêm sendo dadas a eles. Prevalece, atualmente, acentuada disparidade entre os verdadeiros julgamentos aplicados à triagem neonatal e à rotina da prática clínica (DHONDT, 2007; POLLIT, 2007).

Entre as doenças que preenchem os critérios referidos, está a deficiência de biotinidase (DB), que foi descoberta em 1983 (Wolf *et al.*, 1983). Trata-se de um EIM com herança autossômica recessiva e fenótipo bastante variado. A DB foi incluída na triagem neonatal em 1984, no estado da Virgínia, nos EUA, a partir do método desenvolvido por Heard, Mcvoy e Wolf (1984), que determina a concentração de biotinidase em amostras de sangue seco coletadas em PF.

Essa doença metabólica é causada pela deficiência da enzima biotinidase, que leva à depleção da biotina endógena. Isto ocorre devido à incapacidade do organismo em fazer a reciclagem da mesma ou usar a biotina ligada à proteína fornecida pela dieta, culminando

com um quadro de deficiência múltipla de carboxilases (DMC), na forma tardia ou juvenil (WOLF, 2003).

Clinicamente, a DB manifesta-se geralmente a partir da sétima semana de vida com distúrbios neurológicos e cutâneos tais como crises epiléticas, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hipotonia, microcefalia, alopecia e dermatite eczematoide. As sequelas neurológicas em pacientes não tratados precocemente são frequentemente distúrbios auditivos, visuais, assim como atraso motor e de linguagem. Podem ocorrer alterações metabólicas, sendo as mais frequentes: cetoacidose, hiperamonemia e acidúria orgânica distúrbios provenientes da deficiência secundária das atividades de enzimas biotina-dependentes: acetil-CoA, propionil-CoA carboxilase, piruvato-CoA carboxilase e β -metilcrotonil-CoA carboxilase (WOLF, 2001 e 2003).

O diagnóstico consiste na detecção da atividade da enzima no soro dos pacientes. Baseado nessa análise, podem-se classificar os pacientes em dois subgrupos: deficiência profunda ou parcial, na qual a atividade da enzima encontra-se, respectivamente, inferior a 10% da atividade média normal e entre 10 e 30% da atividade média normal. Esse método pode ser complementado pelo estudo de ácido desoxirribonucleico (DNA) para detecção de mutações no gene biotinidase (BTD gene) localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p25) (WOLF, 2001).

O tratamento dessa condição, quando iniciado nos primeiros meses de vida, evita o aparecimento dos sintomas já referidos. É muito simples e de baixo custo, pois consiste na reposição oral de biotina, na dose que varia de 5 a 20 mg diariamente, por toda a vida (WOLF, 2001 e 2003).

A DB preenche alguns critérios para ser incluída na triagem neonatal, uma vez que os pacientes afetados não mostram sinais clínicos nesse período da vida, é uma doença com alta morbidade e, segundo Wolf (2003), esse EIM está entre os que verdadeiramente têm tratamento efetivo e acessível.

Em vários países, essa doença foi incluída na triagem neonatal (Wolf; Heard, 1990) e a partir dessa experiência inúmeros trabalhos vêm mostrando diferenças significativas no seguimento em longo prazo dos pacientes detectados no período neonatal (assintomáticos) em comparação com aqueles diagnosticados em vigência das manifestações clínicas da doença (sintomáticos). Em 2004, Weber e Baumgartner publicaram um estudo de seguimento a pacientes com DB e concluíram, concordando com outros autores (WOLF, 2003), que os pacientes diagnosticados em período sintomático frequentemente têm atraso no desenvolvimento e risco de desenvolverem sequelas auditivas, visuais e de funções

nervosas superiores, irreversíveis, diferentemente do que se observou nos pacientes diagnosticados em fase pré-sintomática (período neonatal).

A prevalência da DB pode variar de acordo com a população estudada. Baseada em 36 programas de triagem neonatal para DB em 1990, numa amostra de 8.532.617 RNs, a incidência mundial combinada de DB (deficiência total e parcial) foi estimada em 1:60.089 nascidos vivos (NVs) (WOLF; HEARD, 1990). Em 2001, em um estudo realizado na Áustria, no qual foi triado 1,1 milhão de recém-nascidos, encontrou-se incidência de 1:59.800 NVs para DTB e de 1:89.000 NVs para DPB (MUHL *et al.*, 2001). No Brasil existem poucas publicações sobre a prevalência da DB. Entre elas, cita-se a de Pinto, em dissertação de mestrado (1995) realizado na cidade de Curitiba, na qual foram analisadas 125.000 amostras de sangue seco em PF de RN durante o programa estadual de triagem neonatal (PETN) do estado do Paraná, num período de oito meses, cuja prevalência combinada da DB foi de 1:62.500 NVs. Em 2004, na cidade de Porto Alegre, Camargo Neto *et al.* conduziram um estudo privado durante quatro anos, em que houve colaboração de várias regiões do país, em uma população de 225.136 amostras de sangue seco em PF de RN, referindo incidência combinada de DB de 1:9.000 NVs.

Diante da divergência de prevalências registrada nos diferentes estudos nacionais, verificou-se a necessidade de realizar-se um estudo regional. Em 2007, trabalhando no Hospital das Clínicas da UFMG como médica neuropediatra, surgiu a possibilidade de realizar a atual pesquisa, que foi motivada principalmente pela necessidade de se determinar a prevalência de DB no estado de Minas Gerais, fornecendo, assim, subsídios para avaliação da implantação de um programa de triagem neonatal para DB em nosso estado. O projeto contou com todo o apoio logístico do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (NUPAD/FM/UFMG), permitindo a realização deste estudo.

Os resultados desta pesquisa trazem alguns subsídios para discussão acerca da implantação ou não de teste de triagem para DB no PTN do estado de Minas Gerais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo do artigo I

Revisar a literatura nacional e internacional referente à deficiência de biotinidase (DB), com ênfase em seus aspectos bioquímicos, fisiopatológicos, clínicos e genéticos, além dos dados sobre a triagem neonatal.

2.2 Objetivos do artigo II

2.2.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência da DB no estado de Minas Gerais, na população de recém-nascidos participantes do Programa Estadual de Triagem Neonatal em Minas Gerais (PETN-MG), no período de setembro de 2007 a junho de 2008.

2.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar e acompanhar clinicamente os casos de DB diagnosticados neste estudo e tratados precocemente;
- avaliar a presença de atividade epileptiforme e/ou anormalidades da atividade de base, no eletroencefalograma, dos casos de DB identificados neste projeto, previamente à instituição do tratamento.

3 ARTIGO I - DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE: ASPECTOS BIOQUÍMICOS, CLÍNICOS, GENÉTICOS E A TRIAGEM NEONATAL (ARTIGO DE REVISÃO)

Resumo

O presente estudo é uma revisão da literatura sobre a deficiência de biotinidase, uma doença metabólica hereditária com expressão fenotípica variada, na qual há defeito no metabolismo da biotina. A sintomatologia em pacientes que apresentam a forma clássica é frequentemente neurológica e cutânea, podendo ocorrer sequelas como: distúrbios auditivos, visuais, assim como atraso motor e de linguagem. Tais manifestações são geralmente irreversíveis, mesmo após instituição do tratamento, que é muito simples e de baixo custo, pois consiste na reposição oral de biotina, na dose de 5 a 20 mg diariamente, por toda a vida. O tratamento, quando iniciado nos primeiros meses de vida, evita o aparecimento dos sintomas já referidos. A prevalência combinada da doença é variável, há relatos de 1:60.000 a 1:9.000, ressaltando-se a importância de estudos de prevalência regionais. A deficiência de biotinidase, portanto, preenche critérios da Organização Mundial de Saúde para ser incluída na triagem neonatal: os pacientes afetados não mostram sinais clínicos nesse período da vida, é uma doença com alta morbidade e possui tratamento efetivo e de baixo custo.

Palavras-chave: Biotina. Biotinidase. Deficiência/biotinidase. Triagem neonatal.

ARTICLE I - BIOTINIDASE DEFICIENCY: BIOCHEMICAL, CLINICAL, GENETICAL ASPECTS AND THE NEWBORN SCREENING (REVIEW ARTICLE)

Abstract

This study is review on the literature about biotinidase deficiency, an inherited metabolic disease with varied phenotypic expression, in which there is a defect in the biotin metabolism. The symptoms in patients with the classic form are often neurological and cutaneous, and sequels may occur such as hearing and visual disorders, as well as motor and language delay. Such events are usually irreversible, even after starting the treatment, which is very simple and low cost, as it consists in the biotin oral replacement, in 5 to 20 mg daily, for life. The treatment, when started early in life, prevents the onset of the mentioned symptoms. The disease combined prevalence is variable, there are reports of 1:60.000 to 1:9.000, highlighted the relevance of the studies on the regional prevalence. Therefore, the biotinidase deficiency meets the World Health Organization criteria to be included in the newborn screening: the affected patients show no clinical signs during this period of life, it is a disease with high morbidity levels and there is an effective and low cost treatment for it.

Keywords: Biotin. Biotinidase. Deficiency/biotinidase. Newborn screening.

3.1 Introdução

O presente estudo é uma revisão da literatura sobre a deficiência de biotinidase (DB), uma doença metabólica hereditária com expressão fenotípica variada, na qual há defeito no metabolismo da biotina. A doença é classificada em dois subgrupos: deficiência total (DTB) e parcial (DPB), cuja atividade sérica da enzima encontra-se, respectivamente, inferior a 10% e entre 10 e 30% da atividade média normal¹⁻⁴.

Clinicamente, a forma clássica manifesta-se geralmente a partir da sétima semana de vida com distúrbios neurológicos e cutâneos tais como crises epiléticas, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, hipotonia, microcefalia, alopecia e dermatite eczematoide. As sequelas neurológicas em pacientes não tratados precocemente são frequentemente distúrbios auditivos, visuais, assim como atraso motor e de linguagem. O tratamento dessa condição, quando iniciado nos primeiros meses de vida, evita o aparecimento dos sintomas já descritos. É muito simples e de baixo custo, pois consiste na reposição oral de biotina na dose de 5 a 20 mg diariamente, por toda a vida^{1,2}.

A DB, portanto, preenche critérios da Organização mundial de saúde (OMS) para ser incluída na triagem neonatal: os pacientes afetados não mostram sinais clínicos no período neonatal, é uma doença com alta morbidade e possui tratamento efetivo³.

3.2 Método

Realizou-se uma pesquisa bibliográfica em artigos, periódicos nacionais e internacionais, manuais do Ministério da Saúde, livros, teses e dissertações, nos idiomas: português, inglês e espanhol, num período compreendido entre 1998 e 2009. Os artigos e outros materiais foram selecionados de acordo com a relevância do tema. Foram incluídos alguns artigos clássicos da literatura, publicados previamente ao período referido, devido à sua importância histórica.

A pesquisa foi realizada nas seguintes bases de dados: *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO), Centro Latino Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (LILACS), MEDLINE, PUBMED e Livraria Cochrane.

3.3 Revisão da literatura

3.3.1 Deficiência de biotinidase

3.3.1.1 Definição

É uma doença metabólica hereditária, herdada de forma autossômica recessiva, com expressão fenotípica variada e na qual há deficiência da enzima biotinidase. Essa deficiência acarreta depleção da biotina endógena devido à incapacidade do organismo em fazer a reciclagem da mesma ou usar a biotina ligada à proteína fornecida pela dieta, originando, por sua vez, quadro de deficiência múltipla de carboxilases (DMC) na forma tardia ou juvenil (Mckusik 253260)¹⁻⁴.

3.3.1.2 Aspectos metabólicos

3.3.1.2.1 Biotina

Em 1916, um estudo conduzido em ratos demonstrou efeitos tóxicos devido a uma dieta restrita à clara de ovo seca oferecida a esses animais, provocando alterações neurológicas e cutânea, que ficou conhecida como *egg white injury*. Essa condição podia ser prevenida por alimentos que continham uma substância que, posteriormente, foi denominada biotina, segundo Bateman (1916), e tinha como antagonista a glicoproteína avidina, que causava as lesões⁴.

A biotina é uma vitamina do complexo B, hidrossolúvel, um nutriente essencial para o nosso organismo. Seu papel nas células permanece parcialmente entendido⁵. Está diretamente envolvida em importantes processos metabólicos como a gliconeogênese, a síntese de ácidos graxos e o catabolismo de vários aminoácidos de cadeia ramificada em seres humanos que não a sintetizam. Portanto, é necessária sua ingestão adequada através de alimentos que devem compor a dieta, como: gema de ovo, fígado, rim, alguns vegetais, entre outros, que a contêm em baixa concentração, porém suficiente para o equilíbrio da demanda metabólica do organismo. Possivelmente, a biotina também é derivada da síntese da microflora intestinal⁴⁻⁶.

A absorção intestinal da biotina em seres humanos ainda carece de elucidação. Said conduziu vários trabalhos a respeito da absorção de biotina livre no intestino grosso e

intestino delgado e verificou que a vitamina é absorvida através de um mecanismo de saturação e um transportador Na⁺ dependente que também transporta ácido pantotênico e lipoato, o *sodium-dependent mult-vitam transporter* (SMVT)^{6,7}.

A biotina tem a função de ativar as enzimas que possuem a propriedade de transportar grupos carboxílicos: a piruvato-carboxilase (importante na gliconeogênese); propionil-CoA carboxilase (importante para o catabolismo da isoleucina, treonina, valina e metionina); β-metilcrotonil-Co-A carboxilase (atua no catabolismo da leucina); acetil-CoA: ACC-β (isoforma da acetil-CoA que controla a oxidação dos ácidos graxos); e a acetil-CoA carboxilase (isoforma ACC-α que controla a síntese dos ácidos graxos). As carboxilases (enzimas biotina-dependentes) são sintetizadas como apocarboxilases e necessitam de biotina para serem ativadas, o que ocorre a partir da união covalente de um grupamento carboxílico da biotina com o grupo ε-amino de um resíduo da lisina da apocarboxilase^{4,6}.

A biotinilação das apocarboxilases compreende duas etapas parciais: ativação da biotina pela adenosina trifosfato (ATP), que resulta na formação de um composto intermediário biotinil-adenilato. Posteriormente, este composto se liga às apoenzimas, transformando-se em carboxilases enzimaticamente ativas. As duas reações são catalisadas pela holocarboxilase sintetase (HCS)^{4,6}. O passo final da degradação das carboxilases é o rompimento da fração biotinil do grupo ε-amino da lisina (composto que recebe o nome de biocitina), que é catalisada pela biotinidase, resultando na liberação da biotina livre, a qual pode ser novamente reciclada⁸. Essas reações bioquímicas estão demonstradas na FIG. 1.

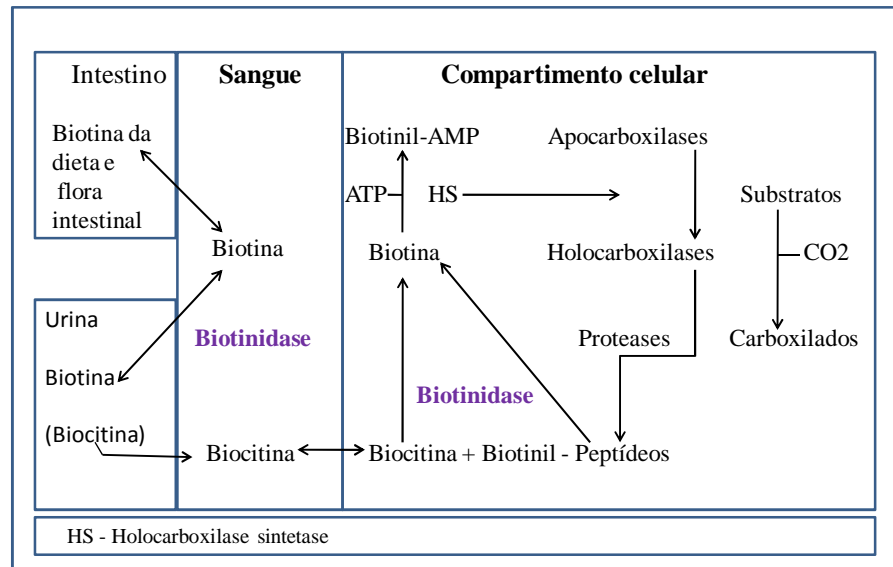


Figura 1 – Ciclo da biotina.

Fonte: Pinto (1999)⁸.

Estudos *in vitro* da recaptação de biotina intestinal têm revelado que a biocitina é um potente inibidor competitivo da absorção da biotina. É possível que um aparente defeito na excreção renal e intestinal de biotina possa refletir inibição competitiva da biocitina endógena em sujeitos afetados por DB².

A deficiência de biotina pode ocorrer em pacientes com alimentação parenteral total; em pessoas que ingerem grande quantidade de clara de ovo cru, que contém avidina, que é uma proteína que se liga fortemente à biotina impedindo sua absorção intestinal; em crianças com desnutrição proteico-calórica grave e em pessoas com erros inatos do metabolismo (deficiência de biotinidase). Pode ser observada também em indivíduos com síndrome do intestino curto, em hemodiálise crônica, uso prolongado de alguns fármacos antiepilépticos (carbamazepina, fenitoína, primidona) e antibióticos, provavelmente por inibir a absorção de biotina em nível intestinal ou acelerar o seu catabolismo^{4,7,9-11}. Além disso, pode ocorrer com o decréscimo de uma proteína que tem importante papel na homeostase da biotina: SMVT, que atua no transporte da biotina livre no intestino, fígado, tecidos periféricos e reabsorção renal⁷.

De acordo com a *Food and Nutrition Board of the National Research Council*, os requerimentos diários de biotina são os seguintes: adulto e mulheres grávidas – 30 µg; durante a lactação 35-30 µg; lactentes (0-5 meses) – 5 µg⁶.

Existe uma possibilidade de que a biotina esteja envolvida em malformações fetais em humanos. Em estudos animais, está claramente comprovado que a deficiência de biotina é teratogênica. As mais comuns malformações em ratos com deficiência de biotina incluem: fenda palatina, micrognatia, micromelia e sindactilia^{4,6,7}.

As células deficientes em biotina exibem acentuada suscetibilidade a dano oxidativo em resposta ao estresse⁷.

3.3.1.2.2 Biotinidase

A biotinidase (biotin-amido-hidrolase) (EC 3.5.1.12) é uma enzima de fundamental importância no ciclo da biotina. Inicialmente, considerava-se que sua atividade principal era de hidrólise, sendo seu substrato a biocitina. Posteriormente, os estudos demonstraram sua importância como transferase e como carreadora da biotina. A função da biotinidase é liberar a biotina, ligada covalentemente à proteína ou aos peptídeos biotinilados, da dieta ou da biocitina endógena¹⁰.

A região do cDNA que codifica a enzima foi identificada em preparado de fígado humano, por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). O *locus* gênico da biotinidase foi mapeado por Cole *et al.* no cromossomo 3, região p25^{1,4}.

A degradação proteolítica das carboxilases resulta na formação de biocitina e indivíduos com a DB não conseguem clivá-la, mas como é uma substância hidrossolúvel, é facilmente excretada pela urina, portanto, pode ser encontrada em altas concentrações na urina desses pacientes^{2,10}.

Hart *et al.* relataram que a biotinidase sérica normal tem no mínimo nove isoformas, quatro maiores e cinco menores. Nenhuma correlação foi reportada entre a idade de início ou a gravidade dos sintomas e os padrões das isoformas nas crianças sintomáticas⁴.

3.3.1.3 Epidemiologia

A incidência mundial de DB baseou-se em 36 programas de triagem neonatal em 1990, envolvendo um total de 8.532.617 recém-nascidos (RNs) triados. Encontraram-se as seguintes taxas: DTB 1: 112.271 nascidos vivos (NVs) variando de 1:85.000 a 1:145.000 e DPB 1:129.282 NVs variando de 1:112.700 a 1:177.000. A incidência combinada de DTB

e DPB foi de 1:60.089 NVs (1:49.500 e 1:73,100), com intervalo de confiança de 95%¹². Nos países em que a consanguinidade é elevada encontram-se altas taxas de prevalência, como na Turquia, 1:14.866 NVs¹³. No Brasil, os estudos que abordam o tema em questão são escassos e os resultados são discordantes. Num estudo realizado no Paraná com 125.000 RNs triados, foram encontrados os seguintes valores: prevalência combinada de DB 1:62.500 NVs, DTB 1:121.000 NVs e DPB 1:121.000 NVs¹⁴. Em 2004, um estudo privado em que houve colaboração de várias regiões do país salientou que entre 225.136 RNs triados, a prevalência combinada foi de DB 1:9.000 NVs, DTB 1:14.192 NVs e DPB 1:9000 NVs¹⁵. Mais detalhes serão abordados no tópico referente à triagem neonatal.

3.3.2 Manifestações clínicas

3.3.2.1 Deficiência total de biotinidase

A DTB (menos de 10% da média da atividade sérica normal) na maioria das crianças não tratadas entre o segundo e o quinto mês de vida pode expressar-se clinicamente com sintomas neurológicos e cutâneos, como: crises epiléticas, hipotonia, ataxia, *rash* cutâneo, alopecia parcial ou total e conjuntivite. Normalmente, os sintomas só aparecem após a depleção dos estoques de biotina acumulados durante a vida intrauterina. Há casos confirmados de aparecimento mais precoce na primeira semana de vida e casos de aparecimento na adolescência¹⁻⁴. Os lactentes com DB amamentados ao seio materno podem desenvolver sintomas clínicos mais precocemente que aqueles alimentados com fórmulas lácteas, uma vez que estas contêm mais quantidade de biotina que o leite humano². Muitas crianças desenvolvem atraso no desenvolvimento, perda ou deficiência auditiva, problemas visuais incluindo atrofia óptica, condições que normalmente não são reversíveis com o uso da biotina¹.

Wolf descreveu os achados clínicos mais relevantes observados em 80 pacientes referidos na literatura⁴. A alopecia, o atraso no desenvolvimento, a hipotonia muscular, as crises epiléticas, o *rash* cutâneo e as infecções de pele foram vistas em mais de 50% dos casos. Em segundo lugar, entre 25 e 50% dos casos, verificaram-se ataxia, conjuntivite, deficiência auditiva, letargia, problemas respiratórios e anormalidades visuais. Em menos frequência (entre 10 e 25%), notaram-se dificuldades de alimentação coma diarreia e infecções por fungo. Os achados menos frequentes, vistos em menos de 10% dos afetados,

foram hepatomegalia, problemas de linguagem e esplenomegalia. Descrevem-se, ainda, em pacientes adultos, sonolência, alucinações e parestesias⁴.

3.3.2.2 Neurológicas

3.3.2.2.1 Crises epilépticas

A atividade de biotinidase no cérebro humano normal e no líquido é muito baixa. O cérebro pode tornar-se incapaz de reciclar a biotina e pode depender da biotina transportada através da barreira hematoencefálica. Os estágios precoces da deficiência dessa substância que ocorrem na DB podem resultar em acúmulo de lactato no cérebro. Essa acidose láctica localizada pode causar o aparecimento de sintomas neurológicos, como crises epilépticas, antes que outros sintomas clínicos surjam¹⁶.

Os mesmos autores avaliaram 78 crianças sintomáticas identificadas com DB, entre as quais 55% tiveram clinicamente episódios sugestivos de crises epilépticas. O tipo de crise epiléptica mais frequente foi tônico-clônico-generalizadas (TCG), semelhante ao que se observa na maioria das doenças metabólicas herdadas. Os espasmos infantis e as crises mioclônicas foram registradas em 16% dos casos. As crises focais foram raramente descritas. Destaca-se que as crises ocorreram, frequentemente, em concomitância com outros achados clínicos característicos dessa desordem. A média da idade de apresentação foi de 8,5 meses e variou de 2,5 a 24 meses. As crises epilépticas foram controladas por fármaco antiepiléptico (FAE) em 22 dos 43 (51%) pacientes, em monoterapia ou em combinação, porém nenhum controlou de forma persistente as crises epilépticas. Uma vez feito o diagnóstico de DB e iniciada a terapia com biotina, não foi necessário continuar o tratamento com FAE. Entre os pacientes que tinham traçados eletroencefalográficos disponíveis para análise, três mostraram-se normais e 16 anormais. Entre as crianças com eletroencefalogramas (EEG) normais, uma tinha crises clônicas generalizadas iniciadas aos 5,5 meses e outra tinha crises parciais iniciadas na quarta semana de vida, que subsequentemente tornaram-se generalizadas. Detalhes específicos das crises epilépticas não estavam disponíveis no terceiro paciente, com EEG normal. Dois tinham EEGs com lentificação e dois tinham EEGs reportados como anormais, sem descrições mais detalhadas. Em avaliações subsequentes, após tratamento com biotina e cessação das crises epilépticas, os EEGs de seis crianças tornaram-se normais, com marcante melhora (46%). Os EEGs de quatro pacientes continuaram anormais. Os autores enfatizam a importância

de se considerar um ensaio terapêutico com 5 a 10 mg de biotina via oral em lactentes ou em crianças mais jovens que apresentem crises epilêpticas de difícil controle e de etiologia não definida, que não tenham sido submetidas à triagem neonatal para DB, especialmente se elas apresentarem alguma outra manifestação clínica da doença¹⁶.

3.3.2.3 Deficiência auditiva

Num estudo preliminar para verificar a ocorrência de perda auditiva com DTB, foram obtidos dados de 33 crianças de 29 famílias identificadas após período neonatal ou triagem. A perda auditiva foi evidente em 76% das crianças, sendo que 2/3 delas necessitaram de prótese auditiva. A idade média da perda auditiva foi de 32,5 meses, dentro do período crítico do desenvolvimento normal da linguagem. Não existiram diferenças estatísticas entre a idade média do início dos sintomas e a idade média do diagnóstico entre as crianças com e sem perda auditiva. Registrou-se elevada incidência de problemas de linguagem e de aprendizado nas crianças com perda auditiva (78 e 70%, respectivamente) e sem perda auditiva (62 e 50%, respectivamente). A audiometria típica encontrada pelos pesquisadores foi de moderada a acentuada perda auditiva neurossensorial. Na maioria dos indivíduos com DTB que foram estudados evolutivamente, após instituição do tratamento essa perda não pareceu ser progressiva. No entanto, em baixo número de crianças destacou-se discreta deterioração na audição, embora contínua, sendo que uma delas mostrou melhora da audição com o tempo, após o início do tratamento com biotina^{17,18}.

Estudo conduzido na Turquia incluiu 20 crianças com DTB que foram submetidas a testes audiológicos¹⁹. Destas, 17 foram diagnosticadas no período sintomático e três em fase pré-sintomática, pois eram irmãos de crianças previamente afetadas. Foi observada perda auditiva neurossensorial em aproximadamente 55% dos casos. A perda auditiva variou de discreta a acentuada. Diferença estatística significativa foi constatada nos resultados dos testes de potencial evocado auditivo central entre as crianças diagnosticadas logo após o nascimento e os irmãos diagnosticados mais tardiamente. E latências mais prolongadas foram encontradas no grupo com diagnóstico tardio quando comparado com o de diagnóstico precoce ($p > 0,05$). Os autores concluíram que o diagnóstico precoce é importante para prevenir deficiência auditiva periférica e central. Na maioria dos relatos da literatura, apesar do tratamento, quando o diagnóstico é tardio a lesão auditiva geralmente é irreversível^{19,20}.

O estudo conduzido na Turquia realçou que crianças com sintomas de DTB com *null* mutações desenvolveram perda auditiva com mais frequência que aquelas com mutações *missense*, quando não tratadas em tempo hábil. Os autores sugerem que se pode prevenir perda auditiva em crianças com mutações *null* se o tratamento for iniciado logo após o nascimento²⁰.

Em 2000 foi referido um caso de DTB em que houve melhora do quadro de perda auditiva neurossensorial, acentuada, bilateralmente, diagnosticada aos três meses de idade após tratamento com 20 mg de biotina, diariamente²¹. No mesmo trabalho, os autores citam mais dois casos um acompanhado por Nothjunge *et al.* (1989), e outro por Wolf (em comunicação pessoal)²¹.

Os achados imuno-histoquímicos preliminares sugerem que a biotina e a biotinidase desempenham papel fundamental, talvez o mais importante, na estrutura e nos processos funcionais nos sítios cocleares e retrococleares. Crianças com DMC podem ser afetadas por deficiência de holocarboxilase sintetase (HCS) e/ou DB, mas somente a DB resulta em deficiência de biotina, acúmulo de biocitina, perda auditiva neurossensorial e atrofia óptica. Portanto, a biotinidase deve exercer importante papel na função normal dos sistemas auditivo e visual. A função da biotina e da biotinidase no sistema auditivo, assim como mecanismo da perda auditiva na deficiência de biotinidase, permanece ainda desconhecida²².

3.3.2.4 Distúrbios visuais

A avaliação de 78 crianças com DB sintomática relatou 51% delas com anormalidades oftalmológicas, incluindo infecções (30%), neuropatia óptica e distúrbios visuais (13%), distúrbios da motricidade ocular (13%), alterações pigmentares da retina (4%) e alterações pupilares (1%). Os achados mais frequentes foram atrofia óptica e ceratoconjunctivite^{4,23}.

A maioria das crianças que apresentaram atraso de desenvolvimento tinha atividade de biotinidase inferior a 1% não diagnosticada pela triagem neonatal. Todas as quatro crianças com atrofia óptica persistente tinham atividade de biotinidase inferior a 1%, nenhuma detectada pela triagem neonatal ou tratada no período pré-sintomático²⁴.

3.3.2.5 Comprometimento da medula espinhal

No acompanhamento a quatro pacientes com DB com início na infância tardia aos oito anos ou na adolescência, verificou-se que eles apresentaram paresia espástica em membros, clônus, perda da acuidade visual e escotoma. O estudo molecular desses pacientes revelou diferentes mutações que já haviam sido descritas em outros indivíduos com manifestações clínicas mais precoces. Desta forma, destacou-se que não houve correlação entre o genótipo e o fenótipo. Os autores mencionaram a possibilidade de que algumas áreas do sistema nervoso central (SNC) sejam mais susceptíveis a alterações metabólicas em fases tardias dessa doença, particularmente na presença de deficiência de biotina marginal causada por estresse, como numa infecção ou desnutrição²⁵.

O comprometimento medular é raro na DB. Na descrição de três casos de crianças portadoras de DB cuja clínica principal foi desmielinização medular progressiva, apurou-se que em uma delas a idade de início dos sintomas foi aos sete anos, concomitante com um quadro de infecção de vias aéreas superiores. Clinicamente, o paciente exibiu paraplegia flácida, sendo a eletroneuromiografia compatível com padrão neurogênico. A ressonância magnética (RNM) revelou desmielinização cervical e torácica. Foi iniciada a suplementação com biotina na dose de 20 mg/dia, notando-se melhora do controle esfíncteriano e das alterações neurológicas com cinco dias de tratamento. Após três meses de tratamento, a força muscular e a RNM mostraram-se normais, quando a biotina foi reduzida a 10 mg ao dia. Aos 11 anos de idade, o resultado do exame clínico era normal e a criança apresentava bom desempenho escolar. Os outros dois casos, apesar da melhora, persistiram com sequelas motoras. Esses achados sugerem que a DB deve ser considerada no diagnóstico diferencial de desmielinização medular de causa desconhecida, uma vez que o tratamento imediato pode cursar com recuperação total ou parcial dos sintomas²⁶.

3.3.2.6 Anormalidades dermatológicas

As alterações dermatológicas são um dos maiores achados clínicos da DB, entre as quais se citam estomatite perioral, fissuras periorificiais, glossite, dermatite periorificial e alopecia parcial ou total. São frequentemente associados a problemas nutricionais, podendo retardar o diagnóstico dessa condição^{26,27}.

Crianças afetadas geralmente apresentam erupção maculopapular não-específica, tipicamente descrita como pele seca rugosa, eritematosa, principalmente em áreas úmidas e

periorificiais, como ao redor da boca, nariz e olhos^{6,27}. Em casos mais graves podem ocorrer liquenificação, crostas e lesões abertas, que podem infectar-se por *Candida*. O cabelo é esparso e fino e as crianças apresentam geralmente alopecia parcial ou total, que inclui as sobrancelhas. O mecanismo pelo qual a deficiência de biotina produz manifestações cutâneas permanece desconhecido. Investigações em 2000 preconizaram seu envolvimento no metabolismo dos lipídeos²⁷.

O comprometimento da síntese ou metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa poli-insaturados é provavelmente mais importante. Muitos estudos em animais deficientes de biotina confirmam a possibilidade de metabolismo anormal desses ácidos e alterações encontradas na composição da pele podem ter importante função nas manifestações cutâneas da deficiência de biotinidase e biotina. Administração de Ômega 6 PUFA em ratos com deficiência de biotina tem prevenido manifestações cutâneas²⁷.

Diagnóstico diferencial inclui: acrodermatite enteropática, dermatite seborreica, imunodeficiências e outras síndromes. As erupções de pele resolvem-se após tratamento, em uma ou duas semanas^{4,27}.

3.3.2.7 Anormalidades respiratórias

Anormalidades respiratórias são reportadas em alguns casos de DB, possivelmente devido à disfunção do centro respiratório. Isto pode estar associado a outros sintomas bulbares, como dificuldades de deglutição, segundo Wolf citado por Yang *et al.* (2007)²⁶.

3.3.2.8 Disfunção imunológica

A DB tem efeitos adversos nas funções imunes celular e humoral. Os defeitos humorais podem ser devidos à deprivação proteica que afeta a síntese de imunoglobulinas. Algumas crianças que desenvolvem dermatite por *Candidas* não apresentam reação aos testes de hipersensibilidade tardia, deficiência de imunoglobulina A e porcentagens subnormais de linfócitos T em sangue periférico. Estudos em animais também identificaram disfunções imunológicas, porém não específicas, de DB⁶.

Os estudos sobre essa condição ainda são contraditórios e há necessidade de mais pesquisas para caracterizar melhor as reais implicações imunológicas em crianças com DB antes e após o tratamento⁴.

3.3.3 Aspectos neuropatológicos

Na literatura é descrito o caso de um menino com regressão psicomotora, que foi a óbito antes do diagnóstico ser estabelecido. O exame pós-morte do cérebro e da medula espinhal revelou lesões necróticas similares às aquelas observadas na doença de Leigh e na encefalopatia de Wernicke. Diferentemente dessas duas condições, estavam afetados também o hipocampo e o córtex para-hipocampal. As lesões mostravam áreas de microcavitação, proliferação capilar e gliose. Na substância cinzenta havia relativa preservação dos neurônios e na substância branca perda da mielina com relativo ou moderado dano axonal. Notou-se astrocitose nos cornos anteriores da medula espinhal e palidez de substância branca cerebelar profunda. Verificou-se também acentuado edema em substância cinzenta profunda do tronco cerebral e da medula espinhal. Os autores sugeriram que essas lesões parecem resultar de uma série de intensos distúrbios metabólicos, talvez ligados à desordem da piruvato carboxilase²⁸.

Em outros dois casos registraram-se degeneração cerebelar crônica, mielopatia subaguda e mielinização defeituosa ou comprometida^{4,28}.

3.3.4 Aspectos de neuroimagem

Na Inglaterra, os resultados neurorradiológicos em cinco pacientes com DTB tiveram diagnóstico antes de ser instituída a triagem neonatal. A idade do diagnóstico variou de quatro semanas a cinco meses e os principais achados da neuroimagem foram leucoencefalopatia e alargamento dos ventrículos e dos espaços liquóricos extracerebrais. As anormalidades da substância branca incluíram atraso na mielinização, mas em alguns pacientes o aumento de sinal foi muito intenso para ser explicado somente como atraso. As alterações subcorticais foram vistas somente em um paciente. Estudos realizados após início do tratamento com biotina obtiveram melhora no padrão de mielinização. Em um paciente observou-se normalização dos espaços liquóricos, porém em outro houve atrofia progressiva e degeneração cística. A maioria dos pacientes teve sequelas neurológicas^{29,30}.

Atrofia cerebral, anormalidades de substância branca e achados menos comuns incluem lesões císticas, aparência radiológica de síndrome de Leigh e calcificações dos gânglios da base. Distúrbios da mielinização e outras anormalidades da substância branca são proeminentes nas formas de início precoce, enquanto que as formas de início tardio são caracterizadas por anormalidades da substância cinzenta e atrofia³¹.

3.3.5 Deficiência parcial de biotinidase

Antes da implementação da triagem neonatal para DB, a DPB era desconhecida. Quando a primeira criança com DPB foi diagnosticada, não havia qualquer informação disponível sobre o prognóstico dessa condição. Foram avaliados 16 casos de DPB - identificados pela triagem neonatal nos EUA - e seus pais, com a finalidade de determinar se a DPB poderia resultar em manifestações clínicas. As atividades séricas da biotinidase foram dosadas e também avaliadas as histórias clínicas dos probandos, dos seus pais e irmãos. Observou-se que todas as crianças com DPB eram saudáveis no tempo do diagnóstico. O tratamento foi realizado em nove crianças e as demais permaneceram sem tratamento, por opção dos pais. Uma das crianças que não tinham iniciado tratamento com biotina desenvolveu tardiamente hipotonia, queda de cabelo e *rash* cutâneo, que foi responsivo à biotina. Foram identificados quatro adultos e três crianças com DPB entre os membros das famílias dos probandos. Todos eram saudáveis e um irmão tinha excreção elevada de lactato na urina. O quinto adulto apresentou sintomas leves, que responderam posteriormente ao tratamento com biotina. Os sujeitos com DPB desse estudo, com exceção de um que desenvolveu sintomatologia, permaneceram livres de sintomas ou os apresentaram de forma discreta e inespecífica. Os autores destacam que o diagnóstico de DPB provavelmente não teria sido feito se não fosse pela triagem neonatal³².

Dos 12 pacientes com DPB de um estudo, 10 estavam disponíveis para o seguimento e permaneceram clínica e neuropsicologicamente normais entre as idades de 2,5 e 10 anos²⁴.

Durante um estudo conduzido em seis pacientes italianos com DPB, destaca-se o caso de um paciente diagnosticado durante a triagem neonatal, que apresentava distúrbio de linguagem, dermatite perioral e vômitos durante quadros infecciosos. No entanto, não havia referência quanto à idade do paciente na época do estudo, nem se estava em tratamento³³.

Em pesquisa conduzida na Hungria entre 1989 e 2001, registraram-se sete crianças diagnosticadas com DPB e confirmadas com estudo molecular. A maioria delas exibia sintomas discretos referidos pelo autor como hipotonia e dermatite em face no momento do diagnóstico, que variou desde várias semanas até meses de idade. Tais sintomas resolveram-se após início do tratamento com biotina³⁴.

A literatura informa um estudo conduzido em Minesota, EUA, que identificou 26 casos de DPB com início do tratamento, em todos, com duas semanas de vida³⁵.

As manifestações dos sintomas na DB não dependem somente do grau de deficiência da enzima, sendo importante também a interação da atividade reduzida de biotinidase com outros fatores, entre eles: a disponibilidade de biotina exógena e a demanda metabólica da vitamina. Os autores informaram que crianças com deficiência total de biotinidase podem desenvolver sintomas precipitados por uma infecção ou outra doença não relatada. É possível que o requerimento de biotina pelo organismo durante períodos de estresse aumente³².

3.3.6 Casos assintomáticos

Há várias referências na literatura a respeito de casos de DB em ambas as formas, identificados na idade adulta ou acompanhados até essa faixa etária e que permanecem assintomáticos. Isso sugere que pode existir suficiente atividade enzimática residual necessária como substrato e, na vigência de um estresse como uma infecção grave, esses indivíduos assintomáticos desenvolveriam os sintomas. Outra possível explicação para essa heterogeneidade clínica são as diferentes variantes no K_m (constante de Michaelis-Menten, que é a concentração de substrato específico na qual uma enzima produz metade de sua velocidade máxima) da biotinidase, fatores relacionados a diferenças dietéticas ou fatores epigenéticos que poderiam proteger alguns indivíduos assintomáticos^{1,4}. Os reais fatores que precipitam sintomas em indivíduos com DB assintomáticos são desconhecidos e eles podem desenvolver sintomas em qualquer idade³⁶.

3.3.7 Métodos diagnósticos

O diagnóstico da DB consiste na determinação da atividade da enzima biotinidase. Pode ser suspeitado na triagem neonatal, confirmado pela dosagem sérica quantitativa da enzima biotinidase e, mais raramente na atualidade, em leucócitos de sangue periférico ou em cultura de fibroblastos obtidos por biópsia de pele.

Um dos testes mais utilizados mundialmente para triagem neonatal é o colorimétrico, em que se mede a capacidade de liberação do substrato artificial N-biotinil p-aminobenzoato (BPABA). Após sua liberação, o BPABA reagirá com os produtos químicos utilizados no teste, produzindo uma cor de acordo com a quantidade liberada. O resultado poderá ser interpretado de forma visual, por densidade óptica ou monitorização

fluorimétrica. Há métodos que utilizam como substrato natural, a biocitina³⁷ e/ou outros derivados da biotina, como biotina-6- amidoquinolina³⁸.

Para a dosagem quantitativa da biotinidase a partir do método colorimétrico, deve-se tomar alguns cuidados para tentar eliminar os falso-positivos, o que pode ocorrer quando a coleta e a estocagem das amostras de sangue forem inadequadas. Objetivando evitar tal erro, Wolf recomenda que as amostras dos pais e um controle que não seja relacionado sejam submetidas concomitantemente com as amostras do probando. Comparando a amostra da criança com o do controle, que deverá ser normal, e com a dos pais, que deverá ter os níveis na faixa de heterozigotos, essa criança verdadeiramente terá a deficiência de biotinidase. Caso o controle externo tenha atividade enzimática abaixo do esperado, então se sugere que as amostras não foram estocadas adequadamente. Esse procedimento pode realmente eliminar a maioria de resultados ambíguos que podem acarretar diagnóstico incorreto¹.

Quando ainda persistirem dúvidas, poderão ser realizadas outras dosagens da enzima, tendo em vista que o uso da biotina pelo paciente não interfere no nível da biotinidase e, neste caso, a dosagem mais elevada é que será considerada mais representativa do genótipo. Em adição, a atividade de biotinidase está correlacionada com vários aspectos, incluindo idade, gênero e a capacidade de síntese de proteína hepática³². O estudo molecular identificando as mutações dos probandos, apesar de oneroso, é, em verdade, no atual momento, o padrão-ouro para o diagnóstico da deficiência de biotinidase.

A forma total da DB apresenta valores abaixo de 10% da média normal da atividade sérica da enzima biotinidase e a forma parcial entre 10 e 30% da média. Em crianças acima de 30 dias de vida, consideram-se os mesmos valores do adulto. No período neonatal, os estudos referem que a baixa atividade da enzima é normal, principalmente nos primeiros dias após o nascimento, consistente com valores entre 50 e 70% da atividade média normal para o adulto³.

3.3.8 Aspectos bioquímicos

Revisão de 80 casos com DTB, em 2003, referenciou, em algum momento da evolução clínica desses pacientes: acidúria orgânica (80%), cetoacidose metabólica (75%), lactacidemia e hiperamonemia¹.

As anormalidades bioquímicas ocorrem devido à DMC e consistem em acidose láctica, aumento da excreção urinária do lactato, ácido β -hidroxi-isovalérico (mais

frequentemente observado), β -hidroxiopropionato, metilcitratos e β - metilcrotonilglicina. A possível normalidade de ácidos orgânicos urinários não afasta a doença. Moderado aumento das quantidades de ácido 3 hidroxivalérico e discreto aumento nos níveis de ácido metilcítrico são fortes indicadores de possível deficiência de biotinidase^{4,6,39}.

As altas concentrações do lactato no SNC podem ser secundárias a alterações da atividade da piruvato carboxilase no próprio cérebro, uma vez que o lactato cruza a barreira hematoencefálica lentamente. A acidose cerebral localizada pode ser a causa de sintomas neurológicos de início precoce⁴⁰.

3.3.9 Aspectos genéticos

A DB, assim como a maioria dos erros inatos do metabolismo, apresenta herança autossômica recessiva. Ambos os gêneros são indistintamente afetados pela deficiência. A prevalência de heterozigotos estimada é de um para cada 123 indivíduos⁴.

O gene humano da biotinidase (BTD: 609019) consiste em quatro exons. O DNA complementar que decifra a biotinidase sérica humana normal já foi clonado e codificado. Análise *Northern blot* tem demonstrado expressão da biotinidase no fígado, rins, pâncreas, pulmão, músculo-esquelético, coração, cérebro e placenta humanos. O gene da biotinidase está mapeado no cromossomo 3p25. E a estrutura genômica do gene da biotinidase está determinada^{1,4}.

Atualmente, são reconhecidas cerca de 110 mutações patogênicas associadas à DTB^{7,35,41}. No Quadro 1 observam-se as mutações mais comuns causadoras de DTB, encontradas nos EUA. Entre elas destacam-se, nas crianças sintomáticas, as seguintes: (G98: del7ins) e 538R>C. Aproximadamente 52% dessas crianças apresentam a mutação (G98: del7ins) em um dos seus alelos e cerca de 30% a mutação 538 R>C, que é a segunda mais comum nessa população. Essas mutações resultam em completa ausência de atividade de biotinil-transferase no soro.

A mutação mais comum de DTB, identificada pela triagem neonatal nos EUA, é a *missense* 456Q>H. Uma criança em homozigose para essa mutação tem atividade de biotinil-hidrolase muito reduzida no soro. Essa mutação é encontrada no mínimo em um alelo em 51% das famílias ou 28% dos alelos estudados^{1,42}. A segunda mutação mais comum é a dupla-mutação, A171T/D444H. Essa combinação causa redução de aproximadamente 95% da atividade biotinil-hidrolase da biotinidase, mas a atividade transferase é mantida⁴¹⁻⁴⁴.

QUADRO 1 - Mutações mais frequentes em pacientes com DTB, sintomáticos e identificados durante a triagem neonatal, nos EUA^{1,41}

Mutação	Pacientes sintomáticos	Pacientes da triagem neonatal	biotynil-hidrolase	biotynil-transferase
G98: del7ins	50% em um dos alelos	Pode ocorrer em um dos alelos	#Ausência completa	#Ausência completa
538R>C	30% em um dos alelos	Pode ocorrer em um dos alelos	#Ausência completa	#Ausência completa
456Q>H	Não ocorreu	51% em um dos alelos	#Atividade muito reduzida	#Ausência completa
D444H: A171T	Não ocorreu	Segunda * mais frequente	#Reduz 95% da atividade	#Atividade mantida

Mutação em homozigose ; ↓- reduzido; * mutação.

A maioria dos indivíduos com DPB tem a mutação D444H em um dos alelos, em combinação com a segunda mutação para DTB no outro alelo^{24,41}. A mutação D444H sozinha causa 48-52% da perda da atividade da enzima aberrante daquele alelo⁴¹. A frequência desse alelo na população geral é estimada em torno de 0,039. A alta frequência na população geral combinada ao fato de estar frequentemente envolvida na DPB faz com que a mutação D444H se assemelhe à variante de Duarte D2 N314D, observada em pacientes com galactosemia. Nessa doença, os heterozigotos compostos que apresentam a variante Duarte D2 N314D em associação com uma mutação clássica da galactosemia, como a comum Q188R, apresentam alterações na atividade sérica da enzima GALT. No entanto, a identificação da mutação N314D GALT é a prova definitiva de que esses RNs não têm a forma clássica da doença.

De modo similar, a mutação D444H é responsável pela vasta maioria de DPB e identificar essa mutação, de forma isolada, num dos alelos é a prova de que a deficiência total da enzima não está presente⁴⁵. Porém, quando a mutação D444H está associada a outra mutação, no mesmo alelo, isto, é uma dupla-mutação (D444H:A171T, D444H:F403V, D444H:R157), resulta em uma mutação causadora de DTB⁴⁵. Em contraste, a mutação A171T, de forma isolada, não foi identificada em nenhum dos alelos em indivíduos normais, nem em indivíduos com DPB e DTB, independentemente de serem sintomáticos, ou identificados durante a triagem neonatal⁴¹.

Na população da triagem neonatal encontra-se marcante heterogeneidade genotípica, diferentemente do que se verifica no grupo de pacientes sintomáticos. Nota-se que duas mutações comuns no grupo de pacientes submetidos à triagem neonatal não ocorreram no grupo de pacientes sintomáticos. Desta forma, acredita-se que indivíduos com certas mutações identificadas na triagem neonatal tenham menos risco de desenvolver sintomas se mantidos sem tratamento.

A avaliação de 33 crianças com DB revelou distinção entre crianças com DTB que tinham menos de 1% do nível sérico de biotinidase e aquelas que tinham nível acima de 1%, sugerindo a possibilidade de pacientes com biotinidase superior a 1% não necessitar de tratamento²⁴. Wolf acompanhou 31 pacientes com DTB detectou 13 casos com nível enzimático inferior a 1% e 18 pacientes cujo nível variou de 1 a 10%. De acordo com o genótipo, 17 crianças tinham mutação *non sense*, deleções e deleção/inserção ou mutações que resultaram em falência para secretar a enzima da célula para o soro, todas resultando na ausência da enzima e deficiência total da atividade da enzima no soro. As demais mutações que eram *missense* resultavam ou não na perda total da atividade enzimática. No grupo de crianças com menos de 1% de atividade, algumas não desenvolveram sintomas durante o seguimento, que variou de meses a anos. Por outro lado, no grupo de pacientes que apresentaram entre 1 e 10% da atividade média normal de biotinidase, alguns exibiram sintomas nos primeiros meses de vida. É esperado que uma criança com perda total de atividade tenha mais risco de desenvolver sintomas, mas uma criança com atividade entre 1 e 10% também pode desenvolvê-los. De acordo com sua experiência, o autor recomenda que todas as crianças com DTB devam ser tratadas com a reposição de biotina^{1,4}.

3.3.10 Diagnóstico pré-natal

O diagnóstico pré-natal da DB é possível a partir da determinação da atividade da enzima em extratos de células de líquido amniótico ou da análise molecular. Considerando-se que o RN afetado por DB é assintomático e que os procedimentos referidos previamente não são isentos de risco, sugere-se dosar a atividade sérica de biotinidase logo após o nascimento, quando a história familiar for positiva⁴⁶.

3.3.11 Diagnóstico diferencial

O principal diagnóstico diferencial da DB é a deficiência de HCS, que é um erro inato do metabolismo raro, que interfere com o metabolismo da biotina, levando à DMC. Em cerca de 50% dos casos descritos o início dos sintomas ocorre nas primeiras semanas de vida. Quando se manifesta mais tardiamente, a clínica não difere daquela observada na DB. Em contraste com os pacientes com DB, todos os afetados com deficiência de HCS apresentam acidose metabólica, hiperamonemia discreta e acidúria orgânica típica. A deficiência de HCS é confirmada pela dosagem da enzima, em cultura de fibroblastos de pele.

Tratamento oral com biotina reverte as alterações clínicas e bioquímicas, nas duas condições, porém, na deficiência de HCS, podem ser necessárias dosagens mais elevadas de biotina, variando entre 40 e 100 mg. Somente na minoria dos casos a resposta é parcial³⁹.

Diferentemente dos casos de DB que costumam cursar com sequelas neurológicas irreversíveis como atrofia óptica e deficiência auditiva neurosensorial, a provável patogênese dessas duas desordens responsivas à biotina é diferente em referência ao SNC, resultando em melhor prognóstico na deficiência HCS quando comparada com DB diagnosticada e tratada tardiamente⁵.

Outros possíveis diagnósticos diferenciais da DB são: deficiência isolada de carboxilase (que não responde ao tratamento com biotina), crianças em uso crônico de alimentação parenteral sem suplementação de biotina ou em uso crônico de dietas contendo escassa quantidade de biotina^{1,4,6}. Em crianças maiores, a *biotin-responsive basal ganglia disease*, uma doença neurológica rara, de etiologia indeterminada, pode cursar com sintomatologia piramidal e extrapiramidal, lesão bilateral na cabeça do núcleo caudado e putâmen, na RNM, que apresenta dramática resposta à biotina⁴⁷.

3.3.12 Tratamento

A dose de biotina para o tratamento de DB, rotineiramente, varia entre 5 e 20 mg/dia, via oral, independentemente da idade e por toda a vida. Essa dose foi determinada empiricamente usando-se a experiência de tratar crianças com várias formas de DMC nas duas décadas passadas. A quantidade de biotina necessária vai decrescendo com o aumento da idade. O único método para monitorar se a dose de biotina está adequada é a dosagem

de ácidos orgânicos na urina, que deverão ter se normalizado. No entanto, cerca de 20% das crianças com deficiência da enzima não apresentam anormalidades na dosagem urinária de ácidos orgânicos, mesmo quando sintomáticos⁴.

Até o momento, não foram descritos indícios de toxicidade causada pelo uso da biotina, mesmo em altas doses.

Existe possibilidade de que a depleção de biotina livre possa ocorrer mais precocemente no cérebro que em outros tecidos em indivíduos deficientes de biotinidase, apesar de não se conhecer o mecanismo que explique tal fato. Portanto, alguns autores têm sugerido que crianças com menos de 15% da média da atividade sérica de biotinidase sejam tratadas com biotina³².

Enquanto há consenso na literatura sobre o tratamento da DTB, o tratamento da DPB é controverso. A forma parcial da DB foi identificada após a implantação da triagem neonatal para essa doença. Ainda permanece incerto na literatura se essas crianças devem receber tratamento ou não. Elas devem ser acompanhadas clinicamente com a frequência necessária para detectarem-se sintomas precoces da DB, segundo Wolf. Esse autor também preconiza que a decisão do tratamento deve ser feita conjuntamente com os pais após a devida explicação sobre as implicações em tratar ou não a DPB¹.

A biotina apresenta-se de várias formas: cápsulas, comprimidos e preparações líquidas. Para ser administrada em uma criança mais jovem, a cápsula pode ser aberta e o conteúdo colocado numa colher. Crianças maiores podem ingerir a cápsula. Os preparados líquidos, em forma de xarope, oferecem mais problemas porque a biotina deve ser mantida em geladeira, pode sedimentar no fundo do frasco e a dosagem real pode ficar aquém do adequado. Nesses preparados, também, algumas bactérias podem proliferar, principalmente quando são estocados por longo tempo. Por estas razões, sugere-se que se utilizem compostos sólidos da vitamina em cápsulas ou comprimidos¹.

3.3.13 Triagem neonatal

A partir do trabalho pioneiro do biólogo Robert Guthrie, nos EUA, em 1960, que desenvolveu um teste de inibição bacteriana para fenilalanina para o diagnóstico de fenilcetonúria em amostras de sangue seco de RNs coletadas em PF, várias doenças vêm sendo incorporadas à triagem neonatal: metabólicas, infecciosas, genéticas, hematológicas, sendo as mais frequentes, além da fenilcetonúria: hipotireidismo, anemia falciforme e fibrose cística. Essa medida foi considerada um sucesso em termos de saúde pública, pois

permite o diagnóstico e tratamento precoce de tais doenças, prevenindo o retardo mental e outras possíveis sequelas. Desta forma, esse método de triagem neonatal vem sendo implantado em vários países e regiões do mundo, de acordo com suas condições econômicas e políticas internas^{48,49}.

Na atualidade, vários outros testes mais sofisticados e rápidos, que ampliam o número de doenças diagnosticadas, como espectroscopia de massa tandem e DNA microarray, já foram adotados por alguns países⁴⁸.

A decisão de incorporar uma doença à triagem neonatal varia consideravelmente, dependendo de cada região ou país. E deve basear-se principalmente na prevalência da doença naquela região, custos dos testes e do tratamento.

Os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) para que uma doença seja incluída na triagem neonatal são baseados naqueles descritos por Wilson e Jungner, em 1968, e são os seguintes: a) ser relativamente prevalente e grave; b) os sintomas devem ser conhecidos e inaparentes no período neonatal; c) ser fácil de ser diagnosticada; d) permitir a realização de um teste viável e com alta sensibilidade e especificidade; e) haver um programa logístico para acompanhamento dos casos até o diagnóstico final; f) o método diagnóstico deve estar disponível para acompanhamento e tratamento das crianças afetadas; g) o programa deve ser economicamente viável; h) ter estabelecido programa de acompanhamento clínico com disponibilização dos quesitos mínimos necessários ao sucesso do tratamento⁵⁰.

A triagem neonatal ficou popularmente conhecida como **teste do pezinho**, pelo fato de ser realizada pela análise de amostras de sangue coletadas do calcanhar do RN. No entanto, o programa de triagem neonatal (PTN) é muito mais amplo e possui diferentes metas além do diagnóstico, tais como: cobertura do programa, idade adequada para a coleta do PF, qualidade técnica no momento da coleta, curto intervalo de tempo entre a coleta, a chegada do material ao laboratório e a emissão do resultado e idade de início de tratamento, entre outros⁵¹. Essas metas servem também para avaliar a qualidade do PTN. Várias ações, na tentativa de padronizar os programas, foram realizadas, ao longo do tempo, culminando com a criação da Sociedade Internacional para Triagem Neonatal (ISNS) e a Sociedade Brasileira de Triagem Neonatal (SBTN).

Na América Latina existe acentuada heterogeneidade entre os PTNs. A primeira iniciativa ocorreu no México, em 1973, por Antonio Velázquez. Posteriormente, quase que simultaneamente, no Brasil, precisamente em São Paulo, Benjamin Schmidt *et al.* iniciaram um projeto que se intitulou: “Um plano nacional para estudo e detecção dos

Erros Inatos do Metabolismo, doenças que podem levar ao Retardo Mental”. Esse projeto cresceu e culminou com a implantação do primeiro PTN para erros inatos do metabolismo (EIM) na América Latina⁵².

Os países da América Latina que apresentam PTNs melhores estruturados são: Cuba, Costa Rica, Chile e Uruguai; em segundo lugar, Brasil, México e Argentina⁵². Em 2005, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) no Brasil tinha cobertura de 80,2%; e 74% dos estados apresentavam cobertura acima de 70%⁵⁴.

O teste do **pezinho** foi incorporado ao Sistema Único de Saúde (SUS) pela Portaria GM/MS nº 22, de 15 de janeiro de 1992, com legislação que determinava a obrigatoriedade de sua realização em todos os RNs vivos e incluía a avaliação para a fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito^{55,56}.

No ano de 2001, o Ministério da Saúde, por intermédio da Secretaria de Assistência à Saúde (SAS/MS), reavaliou a implantação da triagem neonatal no SUS e publicou a Portaria Ministerial nº 822, de 06 de junho de 2001, que criou o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) e também os Serviços de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) em cada estado⁵⁵.

3.3.14 O Programa Estadual de Triagem Neonatal em Minas Gerais (PETN-MG)

O Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio e Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (NUPAD/FM/UFMG) foi credenciado pelo Ministério da Saúde como único SRTN do estado, a partir das normas estabelecidas na Portaria GM 822 de 06 de junho de 2001. Firmou-se a parceria entre a Secretaria de Estado da Saúde (SES-MG) e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) desde setembro de 1993^{51,57}.

Na primeira fase, iniciada em 1993, o PETN-MG, contemplou duas doenças: hipotireoidismo congênito e fenilcetonúria. Na segunda fase, iniciada em março de 1998, de forma universal e pioneira no Brasil, a doença falciforme passou a fazer parte da triagem neonatal em Minas Gerais. A terceira fase foi implantada em 2003, com a inclusão da fibrose cística. No Brasil, somente mais dois estados, Santa Catarina e Paraná, já implantaram a terceira fase, que consiste em: triagem neonatal, confirmação diagnóstica e tratamento das doenças previamente citadas (fase restrita às unidades da federação, com cobertura acima de 70% nas fases um e dois)^{51,52,57}.

Todas as crianças nascidas nos 853 municípios do estado de Minas Gerais têm o direito de fazer o teste de triagem neonatal gratuitamente. A cobertura do PETN-MG é considerada excelente e atinge em torno de 95% dos recém-nascidos vivos, segundo os números do Sistema de Informações de Nascidos Vivos (SINASC). Atualmente, os RNs são testados para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doença falciforme e fibrose cística. O PETN-MG garante tratamento e acompanhamento médicos gratuitos, dependendo da doença testada, fornecimento de medicamentos adequados e dietas especiais. O NUPAD é o executor do PETN-MG e responsável por várias ações associadas ao sucesso do programa, como: busca ativa das crianças suspeitas das doenças testadas, agendamento das consultas especializadas, ação junto às secretarias municipais de saúde para garantir transporte para a criança em tratamento, recepção e acompanhamento da criança e familiares durante as consultas e exames e treinamento de profissionais de saúde envolvidos no programa^{51,57}.

3.3.15 Triagem neonatal para deficiência de biotinidase

A DB foi incorporada à triagem neonatal a partir de 1984, no estado da Virgínia, nos EUA, quando foi desenvolvido um método colorimétrico, simples, utilizado para detectar a ausência ou presença de atividade de biotinidase em amostras de sangue seco de PF em RN, utilizando um substrato artificial B-PABA. A prevalência da doença foi determinada a partir da triagem de 81.243 RNs em um projeto-piloto com 12 meses de duração, quando se identificaram dois RNs com DTB. A partir deles, encontraram-se dois irmãos afetados, secundário à triagem familiar. Com base nesses resultados, concluiu-se que a DB ocorria no mínimo na mesma frequência que outras doenças que faziam parte da triagem neonatal, sugerindo que esse EIM deveria ser incluído na triagem do estado da Virgínia³.

Posteriormente, vários países iniciaram programas-pilotos de triagem para a doença. A incidência mundial, baseada em 36 programas de triagem neonatal para DB em 1990, numa amostra de 8.532.617 RNs, mostrou as seguintes taxas: DTB 1:112.271 NVs (1:85.000 a 1:145.000); DPB 1:129.282 NVs (1:112.700 a 1:177.000) e a incidência combinada de DB foi de 1: 60.089 NVs (1:49.500 a 1:73.100), com intervalo de confiança (IC) de 95%, conforme pode-se visualizar na Tabela. 1¹². No Canadá, em Quebec, entre 163.000 RNs registrou-se prevalência combinada de DB de 1:10.866 NVs. Havia consanguinidade em apenas um caso, o que implicou incidência quatro vezes mais alta que

a encontrada em outros países, sugerindo que o alelo variante para DB era mais comum entre os canadenses descendentes de franceses⁵⁸.

TABELA 1 - Resultados estatísticos da triagem neonatal para deficiência de biotinidase em estudos mundial, realizados em Quebec no Canadá, nacionais, em vários períodos

	Mundial	Quebec	Paraná	Porto Alegre
Período	Jan 1984 a dez 1990 @	Jan 1986 a dez 1987	Março 1994 a nov 1994	Out 1995 a nov 1999
Teste utilizado	Heard <i>et al.</i>	Heard <i>et al.</i>	Heard <i>et al.</i>	Heard <i>et al.</i>
Perdas em %	NR	NR	30	12
Nº de casos identificados	DTB=76 DPB= 66	DTB=3 DPB=12	DTB=1 DPB=1	DTB=3 DPB=11
Nº RNs triados	8 532 617	163.000	125 000	225.136
Prevalência Co. NV	1: 60.089	1:10.866	1:62.500	1:9000
Sensibilidade%	NR	NR	100	100
Especificidade%	NR	NR	99,88	99,88
Falso-positivos #	NR	NR	0,0012	NR
TR %	NR	NR	0,12	0,17

NCI - nº de casos identificados; NV- nascidos vivos, TR- taxa de reconvocação

DTB-Deficiência total de biotinidase; DPB - Deficiência parcial de biotinidase; NR-não referido;

Co- combinada, # = a metodologia para o cálculo dos falso-positivos foram diferentes nos estudos em questão;

@- os dados são de acordo com Wolf e Heard (1990)⁵⁹.

No Brasil há poucas publicações sobre a prevalência de DB. Em estudo realizado no Paraná, referiu-se prevalência combinada de DB de 1:62.500 NVs¹³; em Porto Alegre, um estudo privado, em que houve colaboração de outras regiões do país, reportou prevalência combinada de 1:9.000 NVs¹⁴; estudo retrospectivo de 20.529 amostras de RNs na cidade de Maringá, rastreados pelo PETN no estado do Paraná, no período de setembro 2001 a 2006, ressaltou três casos de DB, numa prevalência combinada de 1:6843. Nesse último estudo, não há referência sobre os tipos de DB, consanguinidade e se os casos poderiam estar relacionados⁶⁰. Os dados estatísticos das regiões referidas anteriormente e outros respeitantes à triagem neonatal estão demonstrados na Tabela 1.

Nos países com consanguinidade elevada, as taxas de prevalência são mais altas, como comprova estudo conduzido na Turquia, que revelou a prevalência de 1:11.614 NVs,

num total de 371.654 RNs triados no período de agosto de 1991 a junho de 1998¹². Na Hungria, entre 1.333.145 RNs triados entre 1989 e 2001, a incidência combinada de DB estimada foi de 1:23000³⁴.

Na Áustria foram identificados, a partir da triagem neonatal de 1.100 milhão de RNs, 21 casos com DTB, incidência de 1:59.800, e 12 com DPB, incidência de 1:89.700; cinco pacientes com nível de biotinidase entre 0 e 1% e 16 com nível de biotinidase acima de 1% e abaixo de 10%. Nesse estudo, somente pacientes com nível de biotinidase abaixo de 1% da média normal exibiram sintomas de aparecimento precoce (3/5). Apresentaram sintomatologia nas primeiras semanas de vida cinco pacientes com atividade entre 1,2 e 6%, que não desenvolveram sintomas clínicos e ainda sem tratamento, entre 3,5 e 21 anos. Foram normais as avaliações clínica e neuropsicológica de todos aqueles com atividade de biotinidase acima de 10% em tratamento com biotina desde as primeiras semanas de vida. O quociente intelectual (QI) foi anormal em cinco pacientes testados cujo tratamento foi iniciado após os 3,5 anos. A conclusão que os autores chegaram a partir da subdivisão em grupos sugeriu que somente pacientes com biotinidase abaixo de 1% desenvolveriam sintomatologia clínica precocemente; e que os pacientes com atividade de biotinidase acima de 1% podem permanecer assintomáticos mesmo sem tratamento, como os pacientes com DPB^{4,24}. Essa conclusão foi contestada por Wolf, argumentando que em sua experiência clínica pacientes com nível de biotinidase acima de 1% também podiam apresentar sintomatologia precocemente, bem como pacientes com biotinidase abaixo de 1% poderiam apresentar sintomatologia mais tardiamente e até permanecer assintomáticos⁴.

A triagem neonatal conduzida na Suíça, após *follow up* de 15 anos (1983 até 1998) com 119 pacientes com DTB de vários países europeus, identificou 37 crianças com DBT (24 sexo masculino, 13 sexo feminino), idade média de seis anos e seis meses (variou de seis meses a 20 anos), provenientes de 31 famílias não-parentes entre si. O tempo de *follow up* durou de cinco meses a 18 anos de idade (média de seis anos e seis meses): 25 crianças foram detectadas pela triagem neonatal e uma por triagem familiar; 11 foram detectadas após terem desenvolvido sintomatologia clínica, sendo de 17,5 meses a média da idade do diagnóstico⁶¹.

Dados publicados em 2007 referentes à triagem neonatal para DB, em países europeus, coletados em 2004, estão demonstrados a seguir, na Tabela 2. Numa amostra de 1.321.989 RNs, a prevalência combinada de DB foi de 1:47.486 entre nove países participantes do estudo⁶². Mais recentemente, um estudo conduzido entre outubro de 2004

e maio de 2008 pela triagem neonatal em Minnesota informou, entre 264.727 RNs, incidência combinada de DB de 1:8.540 NVs, DPB 1:10.181 NVs e DTB 1:52.945 NVs³⁵.

TABELA 2 - Dados referentes à prevalência, taxa de reconvocação, ponte de corte dos métodos utilizados no programa de triagem neonatal para DB, em países da Europa, em 2004⁶²

País	RN*	Lab.	Métodos	PC %	TR %	DC	Prevalência
Áustria	79.022	1	C	Visual	0.014	2	1:39.511
Bélgica Flanders	33.324	1	Wolf	n.d.	n.d.	1	1:33.324
Bélgica	44.651	2	C	10	0.04	–	–
Alemanha	726.973	13	F, C	30	0.05	16	1:45.436
Wallonia	NR	NR	NR	NR	0,21	NR	NR
Itália	105.471	2	C	n.d.	0,03	1	1:105.471
Espanha	20.420	1	C	n.d.	n.d.	1	1:20.420
Suécia	101.471	1	E	20	0.004	3	1:33.817
Suíça	75.842	2	Wolf	n.d.	n.d.	1	1:75.842
Total	1.321.989					25	1:47.486

TR= taxa de reconvocação: porcentagem de crianças referidas para confirmação diagnóstica; PC= ponto de corte, C= colorimétrico; E=enzimático; F=fluorimétrico; W= método de Wolf, NR = não referido, Lab= laboratório; nd = nenhum dado, *triados; DC = diagnóstico confirmado.

A DB, de acordo com a bibliografia consultada, está inserida em PETN no Brasil somente no estado do Paraná. Na América Latina: Argentina - programa obrigatório (PO) e testes feitos quando requisitados (TR). Chile e Colômbia - TR. Costa Rica - programa-piloto (PP). Cuba tem programa não-obrigatório, mas sistemático e de escopo universal. México - programa não-obrigatório⁵³.

Nos Estados Unidos, 29 estados já implementaram PTN para DB^{35,63}. No Canadá, sete estados⁶². A Nova Zelândia tem PTN para DB⁶⁴.

3.3.16 Fatores responsáveis por falso-positivos e falso-negativos nos testes de triagem neonatal para DB

Os testes utilizados para triagem neonatal de DB, tanto em sangue seco como em dosagem sérica de biotinidase, podem sofrer interferência de alguns fatores como possíveis causadores de testes falso-positivos ou falso-negativos, os quais serão relatados a seguir.

3.3.16.1 Fatores responsáveis por falso-positivos

- **Icterícia**

Estudo conduzido na Grécia para esclarecer os problemas dos falso-positivos em RNs na triagem neonatal para DB avaliou a atividade de biotinidase no soro de RNs a termo, prematuros e pequeno para a idade gestacional (PIG), todos os grupos pareados com grupo-controle⁶⁵. Nos neonatos icterícios e controles foram coletados 3 mL de sangue para determinação de bilirrubina total (BT), enzimas hepáticas e atividade de biotinidase, usando método fluorimétrico - HPLC. A pré-incubação da enzima sérica com BT (>10 mg/dL) resultou em 50% ou mais de inibição. Os autores concluíram que a baixa atividade de biotinidase foi encontrada em RNs a termo, prematuros e PIG com icterícia e atribuíram esse dado ao comprometimento da função hepática. Os altos níveis de BT nos grupos estudados poderiam ter papel inibidor da enzima. Desta forma, ressaltam que a idade gestacional (IG) tanto quanto os níveis de BT deveriam sempre ser escritos nos cartões de Guthrie para a correta avaliação da atividade de biotinidase. A partir de níveis de BT de 4 mg/dL, a atividade da biotinidase já decrescia, chegando ao mínimo de sua atividade (1/3 dos controles) com valores acima de 16 mg/dL⁶⁴.

- **Prematuridade**

A atividade de biotinidase em 64 RNs (prematuros e a termo) apresentou correlação direta com a IG. Durante o primeiro e o terceiro dias de vida, as atividades estavam abaixo do considerado normal para adultos em todos os 64 RNs. Em 56 RNs, os níveis foram subindo gradativamente e atingiram o nível normal de adultos entre o 4º-40º dias de vida. Em contraste, a atividade de biotinidase em oito pré-termos reduziu-se durante o 3º-7º dias de vida, compatível com deficiência transitória de biotinidase. Imaturidade da função

hepática seria uma possível causa para explicar esses achados nessas crianças. A menor atividade nessas crianças foi registrada durante o 4^o-6^o dias de vida, que coincide com a época da coleta da amostra de sangue para triagem neonatal. De acordo com esses dados, em 4-8 dos 48 pré-termos ou PIG a atividade de biotinidase variou de 4,7-26% da média dos valores do adulto, sendo compatíveis com testes falso-positivos durante a triagem neonatal⁶⁶.

Em nosso meio, investigou-se, em 1999, o comportamento da biotinidase em 86 prematuros, salientando-se correlação direta entre atividade de biotinidase e idade gestacional. No grupo dos prematuros com IG inferior a 34 semanas, 12 pacientes (26%) apresentaram deficiência transitória de biotinidase compatível com os níveis de deficiência parcial da enzima⁸. Segundo comunicação pessoal de Pinto *et al.*, Dr Harvey Levy, diretor do programa de triagem neonatal de doenças metabólicas no estado de Massachussets, EUA, esclareceu que a amostra sanguínea para triagem neonatal em prematuros é coletada por volta do segundo dia de vida e repetida com 15 dias e, para ele, a prematuridade não influencia os resultados falso-positivos no referido programa⁸.

- **Outros fatores**

Em 2005, foram relatados dois casos de deficiência de lipoproteína lipase comprovados com genética molecular. Ambos os pacientes foram detectados como falso-positivos no teste de triagem neonatal para DB. Os autores concluíram que os testes de triagem neonatal colorimétrico e fluorimétrico para DB que utilizam sangue seco em PF são afetados pela hiperquilomicronaemia acentuada e que mais provavelmente a turbidez acentuada do plasma interfere no teste⁶⁷.

3.3.16.2 Fatores ambientais e técnicos

Em nosso meio, foi avaliada a possível influência de alguns fatores ambientais externos na atividade de biotinidase, amostras de sangue em PF, amostras de plasma de voluntários adultos e também amostras de neonatos em PF. Elas foram submetidas a várias temperaturas de -20°C a 37°C e a atividade da enzima foi medida ao longo do tempo. Verificou-se que o tempo e temperaturas mais elevadas levam à diminuição estatisticamente significativa da atividade da biotinidase, sugerindo que esses dois fatores devam ser levados em consideração na interpretação de um resultado abaixo do normal e

que a coleta de uma nova amostra em condições controladas deva ser considerada para que uma conclusão sobre o caso seja obtida⁶⁸.

3.3.16.3 Fatores responsáveis por falso-negativos

Os testes de triagem neonatal que usam o método colorimétrico podem mostrar atividade de biotinidase marcadamente elevada em crianças que estão sendo tratadas com sulfonamidas², que são primariamente aminas aromáticas como o para-aminobenzoato - o produto clivado do substrato da biotinidase biotinil-para-aminobenzoato - e reagem com as substâncias químicas utilizadas no teste, desenvolvendo cor³. No caso da procaína/benzilpenicilina, a cor é devida ao grupo 4-aminobenzoico na estrutura da procaína. Nessas duas condições pode-se ter falso-negativos. Para eliminar erros diagnósticos, recomenda-se que as duas determinações com e sem substrato sejam feitas simultaneamente no teste^{3,4}.

3.3.16.4 Fatores que podem causar nível de biotinidase sérica marcadamente elevada

É descrito o caso de duas crianças com sintomas sugestivos de deficiência de biotinidase, porém com atividade de biotinidase sérica muito elevada. Baseados em relatos da literatura, os autores diagnosticaram glicogenose tipo Ia (GSD) em ambas. Esse tipo de doença deve ser considerado em crianças com atividade sérica de biotinidase marcadamente elevada. Não se sabe o real motivo dessa elevação⁶⁹.

3.3.17 Conclusão

A deficiência de biotinidase (DB) é uma doença metabólica hereditária, com padrão de herança autossômico recessivo, na qual há deficiência da enzima biotinidase. A incidência mundial combinada de DB é estimada em torno de 1:60.000. No entanto, destaca-se variabilidade na incidência em diferentes países, bem como em trabalhos nacionais, ressaltando-se a importância de estudos regionais.

Clinicamente, a DB manifesta-se com sintomas neurológicos e cutâneos, geralmente a partir da sétima semana de vida. As sequelas neurológicas em pacientes não tratados precocemente são frequentemente distúrbios auditivos, visuais, atraso motor e de linguagem. Contudo, a DB pode ser diagnosticada precocemente, no período neonatal,

ainda em fase assintomática. Além disso, possui tratamento efetivo e de baixo custo, preenchendo, assim, os critérios da OMS para sua inclusão na triagem neonatal, medida já adotada em vários países e regiões do mundo.

O diagnóstico da DB pode ser feito a partir de dosagem quantitativa da enzima biotinidase, que não está isenta de casos falso-positivos - relacionados principalmente a fatores técnicos e ambientais que interferem na coleta e qualidade da amostra analisada ou a variações do genótipo (ex: mutação D444H em homozigose), que podem levar à discreta redução da atividade enzimática sérica. Portanto, alguns autores sugerem que o estudo molecular de DNA assume muita importância, sendo considerado mais recentemente como padrão-ouro na confirmação do diagnóstico dessa doença.

Atualmente, são reconhecidas cerca de 110 mutações patogênicas associadas à DB. Apesar de vários estudos conduzidos com o intuito de correlacionar genótipo-fenótipo, até o momento não foi possível inferir totalmente qual paciente desenvolverá ou não sintomatologia baseado apenas no genótipo ou mesmo na dosagem enzimática.

Quanto ao tratamento, existe consenso na literatura sobre o uso de biotina em pacientes com DTB. Em relação ao tratamento da DPB, observam-se muitas divergências. Um fator que é favorável ao tratamento desses pacientes, descrito por alguns autores, é que as reais consequências de uma deficiência marginal de biotina quando associada a outros fatores desencadeantes não foram totalmente elucidadas, podendo o cérebro ser um dos primeiros órgãos atingidos nessa situação.

Vários trabalhos sinalizam que mais pesquisas sobre a DB são necessárias, principalmente no que diz respeito à identificação e evolução dos casos sintomáticos e assintomáticos, bem como a estudos bioquímicos e moleculares. Tais dados poderão trazer subsídios para a melhor compreensão sobre a variabilidade clínica na DB.

Referências

1. Wolf B. Biotinidase deficiency: new directions and practical concerns. *Curr Treat Options Neurol* 2003; 5(4):321-8.
2. Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL, Parker WD. *et al.* Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *J Pediatr* 1983; 103(2):233-7.

3. Heard GS, Wolf B, Jefferson LG, Weissbecker KA, Nance WE, Mcvovy JR. *et al.* Neonatal screening for biotinidase deficiency: results of a 1-year pilot study. *J Pediatr* 1986; 108(1):40-6.
4. Wolf B. Disorders of biotin metabolism. *In:* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. 8th edition. New York, Mc-Graw-Hill Co, 2001; 3935-62.
- 5 Gravel RA. & Narang MA. Molecular genetics of bitin metabolism:old vitamin, new science. *J Nutric Bioch* 2005; 16:428-431.
- 6 Zempleni J. & Mock DM. Biotin biochemistry and human requirements. *J Nutric Biochem* 1999; 10:128-138.
7. Zempleni J, Hassan IY, Wijeratne SSK. Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2008; 1,3(6):715-724.
8. Pinto ALR. Comportamento da biotinidase em prematuros: Influência da idade gestacional. 1999. 75f. Tese (Doutorado Área de Concentração: Neurologia) Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
9. Rodriguez MR. Importancia del metabolism de la biotina. *Rev Invest Clin* 2000; 52(2):194-9.
10. Hymes J. & Wolf B. Human biotinidase isn't just for recycling biotin. *J Nutr* 1999; 129:485S-489S.
11. Mock DM. & Said H. Introduction t advances in understanding of the biological role of biotin at the clinical, bhochemical and molecular level. *J Pof Nutri* 2009; 139:152-153.
12. Wolf B. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1991; 14:923-27.
13. Baykal T, Huner G, Sarbat G, Demirkol M. Incidence of biotinidase deficiency in Turkish newborns. *Acta Paediatr* 1998; 87(10):1102-3.
14. Pinto ALR. Estudo de prevalência em recém-nascidos por deficiência de biotinidase. 1995. 75f. Dissertação (Mestrado Área de Concentração: Neurologia) Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1995.
15. Camargo Neto E, Rubim R, Lewis E, Demari J, Castilhos C, Brites A. *et al.* Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(3):295-9.
16. Salbert BA, Pellock JM, Wolf B. Characterization of seizures associated with biotinidase deficiency. *Neurology* 1993; 43(7):1351-5.
17. Wolf B, Spencer R, Gleason T. Hearing loss is a common feature of symptomatic children with profound biotinidase deficiency. *J Pediatr* 2002; 140(2):242-6.

18. Welling DB. Long-term follow-up of hearing loss in biotinidase deficiency. *J Child Neurol* 2007; 22(8):1055.
19. Genc GA, Sivri-Kalkanoglu HS, Dursun A, Aydin HI, Tokatli A, Sennaroglu L. *et al.* Audiologic findings in children with biotinidase deficiency in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71(2):333-9.
20. Sivri HS, Genc GA, Tokatli A, Dursun A, Coskun T, Aydin HI., *et al.* Hearing loss in biotinidase deficiency: genotype-phenotype correlation. *J Pediatr* 2007; 150(4):439-42.
21. Strausberg R, Saiag E, Harel L, Korman HS, Ami, J. Reversible deafness caused by biotinidase deficiency. *Pediatr Neurol* 2000; 23:269-270.
22. Heller AJ, Stanley C, Shaia WT, Sismanis A, Spencer RF, Wolf B. Localization of biotinidase in the brain: implications for its role in hearing loss in biotinidase deficiency. *Hear Res* 2002; 173(1-2):62-8.
23. Salbert BA, Astruc J, Wolf B. Ophthalmologic findings in biotinidase deficiency. *Ophthalmologica* 1993; 206(4):177-81.
24. Möslinger DMA, Suormala T, Baumgartner RS, Tiefenthaler M, Muhl A, Seidl R. *et al.* Clinical and neuropsychological outcome in 33 patients with biotinidase deficiency ascertained by nationwide newborn screening and family studies in Austria. *Eur J Pediatr* 2001; 160(5):277-82.
25. Wolf B, Pomponio RJ, Norrgard KJ, Lott IT, Baumgartner ER, Suormala T. *et al.* , Delayed-onset profound biotinidase deficiency. *J Pediatr* 1998; 132(2):362-5.
26. Yang Y, Li C, Qi Z, Xiao J, Zhang Y, Yamaguchi S. *et al.* Spinal cord demyelination associated with biotinidase deficiency in 3 Chinese patients. *J Child Neurol* 2007; 22(2):156-60.
27. Navarro PC, Guerra A, Alvarez JG, Ortiz FJ. Cutaneous and neurologic manifestations of biotinidase deficiency. *Int J Dermatol* 2000; 39(5):363-382.
28. Honavar M, Janota I, Neville BGR, Chalmers A. Neuropathology of biotinidase deficiency *Acta Neuropathol* 1992; 84:461-464.
29. Grünewald S, Champion MO, Leonard JV, Schaper J, Morris AAM. Biotinidase deficiency leukoencephalopathy. *Neuropediatrics* 2004; 35:211-216.
30. Desai S, Ganesan K, Hegde A. Biotinidase deficiency: a reversible metabolic encephalopathy. Neuroimaging and MR spectroscopic findings in a series of four patients. *Pediatr Radiol* 2008; 38(8):848-56.
31. van der Knaap MS, Valk J. Myelin and white matter. Magnetic resonance of myelin, myelination and myelin disorders. 2nd ed, Berlin: Springer; 1995: 1-17. *In:* Grünewald S, Champion MO, Leonard JV, Schaper J, Morris AAM. Biotinidase deficiency leukoencephalopathy. *Neuropediatrics* 2004; 35:211-216.

32. Mcvoy JR, Levy HL, Lawler M, Schmidt MA, Ebers DD, Hart PS. *et al.* Partial biotinidase deficiency: clinical and biochemical features. *J Pediatr* 1990; 116(1):78-83.
33. Funghini S, Donati MA, Pasquini E, Gasperini S, Ciani F, Morrone A. *et al.* Two new mutations in children affected by partial biotinidase deficiency ascertained by newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2002; 25(4):328-30.
34. László A, Sallay E, Endreffy E, Somogyi C, Várkonyi A, Havass Z. *et al.* Neonatal screening for biotinidase deficiency in Hungary: clinical, biochemical and molecular studies. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26(7):693-8.
35. Sarafoglou K, Bentler K, Gaviglio A, Redlinger-Grosse K, Anderson C, McCann M. *et al.* High incidence of profound biotinidase deficiency detected in newborn screening blood spots in the Somalian population in Minnesota. *J Inherit Metab Dis* 2009; 7.
36. Baykal T, Gokdemir Y, Demir F, Seckin Y, Demirkol M, Jensen K. *et al.* Asymptomatic adults and older siblings with biotinidase deficiency ascertained by family studies of index cases. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28(6):903-12.
37. Kumasaka K, Muratsugu M, Fukui T, Kimura M, Tgaki Y, Hashizume N. A new quantitative analytical method a serum biotinidase activity using biocytin as a substrate and its clinical significance in japan. *Clin Chim Acta* 2001; 306:71-7.
38. Broda E, Baumgartner ER, Schooll S, Stopsack HA, Rhode H. Biotinidase determination in serum and dried blood-spots-high sensitivity fluorimetric ultramicro-assay *Clin Chim Acta* 2001; 314:175-185.
39. Baumgartner ER. & Suormala T. Inherited defects of biotin metabolism. *Biofactors* 1999; 10:287-290.
40. Schürmann M, Engelbrecht V, Lohmeier K, Lenard HG, Wendell U, Gärtner J. Cerebral metabolic changes in biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1997; 20(6):755-60.
41. Pindolia K, Jensen K, Wolf B. Three dimensional structure of human biotinidase: computer modeling and functional correlations. *Mol Genet Metab* 2007; 92(1-2):13-22.
42. Norrgard KJ, Hymes J, Wolf B. 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* 1999; 46(1):20-7.
43. Pomponio RJ, Coskun T, Demirkol M, Tokatli A, Ozalp I, Huner G. *et al.* Novel mutations cause biotinidase deficiency in Turkish children. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23(2):120-8.
44. Wolf B, Jensen K, Huner G, Demirkol M, Baykal T, Divry P. *et al.* Seventeen novel mutations that cause profound biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 2002; 77(1-2):108-11.

45. Dobrowolski SF, Banas RA, Naylor EW. Real time PCR assays to detect common mutations in the biotinidase gene and application of mutational analysis to newborn screening for biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 2003; 78(2):100-7.
46. Pomponio RJ, Hymes J, Pandya A, Landa B, Melone P, Javaheri R. *et al.* Prenatal diagnosis of heterozygosity for biotinidase deficiency by enzymatic and molecular analyses. *Prenat Diagn* 1998; 18(2):117-22.
47. Bindu PS, Noone ML, Nalini L, Uday B, Muthane J, Koonor ME. Biotin responsive basal ganglia disease: a treatable and reversible neurological disorder of childhood. *J Child Neurol* 2009; 24(6):750-752.
48. Dhondt JL. Neonatal screening from the Gutrie age to the genetic age. *J Inher Metab Dis* 2007; 30:418:422.
49. Kwon C. & Pm F. The magnitude and challenge of false-positive newborn screening test results. *Arch Pediatr Adolesc Méd* 2000; 154(7):714-8.
50. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais para programa nacional de triagem neonatal. 2. edição ampliada. Brasília-DF 2004.
51. Januário JN. Aspectos relevantes do follow-up da triagem neonatal em Minas Gerais. 10 anos de programa. *Rev Med Minas Gerais* 2003; 13(1 supl. 2):S114-S115.
52. Carvalho TM. Experiência do programa nacional de triagem neonatal do Brasil. *Acta Biochim Clín Latinoam* 2005; 39(4): 516-517.
53. Borrajo GJC. Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century. *J Inher Metab Dis* 2007; 30(4):466-81.
54. Carvalho TM, Santos HP, Vargas PR, Pedrosa J. Newborn screening: a national public health programme in Brazil. *J Inher Metab Dis* 2007; 30(x):615.
55. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 822, de 06 de junho de 2001. Disponível em: [<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2001/GM/GM-822.htm>]. Acessado em 07/11/2009.
56. Sociedade Brasileira de Triagem Neonatal (SBTN). Disponível em: [<http://www.sbtn.org.br>]. Acessada em 08/11/2009.
57. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD), Faculdade de Medicina (sítio eletrônico). 2009. Disponível em: <http://www.nupad.medicina.ufmg.br>. Acessado em 05/12/2009.
58. Dunkel G, Scriver CR, Clow CL, Melancon S, Lemieux B, Grenier A. *et al.* Prospective ascertainment of complete and partial serum biotinidase deficiency in the newborn. *J Inher Metab Dis* 1989; 12(2):131-8.

59. Wolf B. & Heard GS. Screening for biotinidase deficiency in newborns: worldwide experience. *Pediatrics* 1990; 85(4):512-7.
60. Luz GS, Pelloso SM, Higarashi I. Prevalência das doenças diagnosticadas pelo programa de triagem neonatal em Maringá, Paraná, Brasil 2001-2006. *Rev Gaucha Enferm* 2008; 29(3):446-53.
61. Weber P. & Baumgartner ER. Outcome in patients with profound biotinidase deficiency: relevance of newborn screening. *Dev Med Child Neurol* 2004; 46(7):481-4.
62. Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30(4):430-8.
63. Therrel BL, Adams J. Newborn screening in North America. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:447-465.
64. Bridget W. & Veronica W. Newborn Screening. *Pathology* 2008; 40(2) 104-115.
65. Schulpis KH, Tjamouranis J, Karikas GA, Kapiki A, Costalos C. The effect of neonatal jaundice on biotinidase activity. *Early Hum Dev* 2003; 72(1):15-24.
66. Suormala T, Wick H, Baumgartner ER. Low biotinidase activity in plasma of some preterm infants: possible source of false-positive screening results. *Eur J Pediatr* 1988; 147(5):478-80.
67. Santer R, Demirkol M, Gal A, Lukacs Z. Hyperchylomicronaemia due to lipoprotein lipase deficiency as a cause of false-positive newborn screening for biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28(2):137-40.
68. Schulte J. Estudo da estabilidade térmica e temporal da atividade de biotinidase em amostras de sangue (papel-filtro, plasma e soro). 2003 67p (Mestrado: Área de Concentração: Ciências Biológicas - Bioquímica). Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
69. Wolf B, Freehauf JA, Thomas PL, Gordon CL, Greene JC, Ward J. Markedly elevated serum biotinidase activity may indicate glycogen storage disease type Ia. *Inherit. Metab Dis* 2003; 26:805-809.

4 ARTIGO II - TRIAGEM NEONATAL PARA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE NO ESTADO DE MINAS GERAIS (ARTIGO ORIGINAL)

Resumo

Triagem neonatal para deficiência de biotinidase no estado de Minas Gerais

Introdução: a deficiência de biotinidase é uma doença metabólica hereditária, com herança autossômica recessiva, causada por mutações no gene biotinidase (BTD), localizado no braço curto do cromossomo 3(3p25). Geralmente essa doença manifesta-se por meio de distúrbios neurológicos e cutâneos. O diagnóstico consiste na detecção da atividade da enzima biotinidase no plasma, a partir da qual os pacientes são classificados em dois subgrupos: deficiência total ou parcial, na qual a atividade enzimática encontra-se, respectivamente, abaixo de 10% ou entre 10 e 30% da atividade média normal. Estudos de prevalência da deficiência de biotinidase em alguns países mostram taxas que variam de 1:40.000 a 1:60.000. No Brasil, existem poucas pesquisas sobre sua prevalência e há discordância nos resultados encontrados. O objetivo principal deste trabalho foi estimar a prevalência da deficiência de biotinidase no estado de Minas Gerais, com base no teste de triagem realizado em amostras de sangue seco coletadas do calcanhar de recém-nascidos avaliados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal. **Material e métodos:** realizou-se estudo transversal no período de nove meses, de setembro de 2007 a junho de 2008. Foi utilizada parte do sangue dos recém-nascidos, coletada em papel-filtro e enviada ao NUPAD/FM-UFMG, para realização dos exames de triagem neonatal. A triagem foi feita pelo método qualitativo colorimétrico visual UMTEST BIOTINIDASA, desenvolvido em Cuba, e confirmado por dosagem quantitativa de biotinidase. Os pacientes com deficiência de biotinidase confirmada foram submetidos à avaliação clínica e neurológica antes e após o início do tratamento, com biotina 10 mg, via oral, diariamente. **Resultados** foram triadas 182.942 amostras, em duplicata, de sangue seco de recém-nascidos, em papel filtro das quais 1.039 mostraram-se alteradas. Um segundo exame de triagem foi realizado e resultou em 129 amostras suspeitas de deficiência de biotinidase. Destes recém-nascidos, 120 retornaram e foram coletadas amostras para o estudo quantitativo, que confirmou o diagnóstico de deficiência parcial de biotinidase em 10 casos com igual distribuição entre os sexos. Não foram identificados casos de deficiência total de biotinidase. Todos os pacientes apresentavam avaliação clínica e neurológica normais antes e após o início do tratamento. A prevalência de deficiência de biotinidase da população estudada foi de 1:18.289 nascidos vivos. O teste colorimétrico visual foi considerado efetivo em identificar os casos de deficiência de biotinidase e apresentou sensibilidade relativa de 100%, especificidade de 99,94%, falso-positivos de 0,06% e valor preditivo positivo de 8,3%. **Conclusão:** o presente estudo revelou prevalência de deficiência de biotinidase de 1:18.289 nascidos vivos no estado de Minas Gerais, no período de setembro de 2007 a junho de 2008. Essa prevalência mostrou-se mais alta que a encontrada em outros países. Ressalta-se que todos os casos identificados foram classificados como forma de deficiência parcial de biotinidase.

Palavras-chave: Deficiência de biotinidase. Triagem neonatal. Biotina. Biotinidase. Deficiência múltipla de carboxilases.

Abstract

Neonatal screening for biotinidase deficiency in the state of Minas Gerais

Introduction: biotinidase deficiency is an inherited metabolic disorder, autosomal, recessive, caused by gene mutations in the biotinidase (BTD), located in chromosome 3p25. Usually this disorder is manifested through neurological and cutaneous abnormalities. The diagnosis consists in detection of the biotinidase enzyme activity in the plasma, when the patients are classified into two subgroups: profound or partial deficiency, when the enzymatic activity is, respectively, below 10% or between 10 and 30% of the mean normal activity. Studies on the prevalence of biotinidase deficiency in some countries show rates that vary from 1:40.000 to 1:60.000. In Brazil, there are few researches about its prevalence and disagreement on the found results. This paper main objective was to determine the prevalence of the biotinidase deficiency in the state of Minas Gerais, based on the screening test performed with dry blood samples collected from newborn heels evaluated by the Newborn Screening State Program / Programa Estadual de Triagem Neonatal. **Material and methods:** cross-sectional study carried out in the period from September 2007 to June 2008. Part of the newborn blood samples was collected on filter paper and sent to the NUPAD/FM-UFGM, for the newborn screening tests. The screening was done by the visual colorimetric qualitative method UMTEST BIOTINIDASA, developed in Cuba, and confirmed by quantitative dosage of biotinidase. The patients with confirmed biotinidase deficiency underwent clinical and neurological evaluation before and after beginning the treatment with biotina 10 mg, oral via, daily. **Results:** 182.942 newborn's dry blood samples in duplicate were screened, from which 1.039 showed alterations. A second screening test was performed and 129 suspected samples were found for biotinidase deficiency. Among these, 120 newborns returned and samples were collected for the quantitative study that confirmed the partial biotinidase diagnosis in 10 cases with equal distribution between sexes. There was no identification of profound biotinidase deficiency cases. All patients had normal clinical and neurological evaluation before and after the treatment beginning. The prevalence of biotinidase deficiency in the studied population was 1:18.289 live births. The visual colorimetric test was considered effective to identify the biotinidase deficiency cases and showed 100% relative sensitivity, 99,94% specific, 0,06% false positive and 8,3% positive predictive value. **Conclusion:** this study revealed prevalence of biotinidase deficiency of 1:18.289 live births in the State of Minas Gerais, from September 2007 to June 2008. This prevalence proved to be higher than the findings in other countries. It is noteworthy that all the identified cases were classified as partial biotinidase deficiency.

Keywords: Biotinidase deficiency. Newborn screening. Biotina. Biotinidase. Carboxilases multiple deficiency.

4.1 Introdução

A deficiência múltipla de carboxilases (DMC) pode ocorrer devido a duas condições específicas, a deficiência de holocarboxilase sintetase e a deficiência de biotinidase (DB). A primeira é responsável pela forma precoce, com manifestações clínicas ocorrendo preferentemente no primeiro mês de vida; e a DB é responsável pela forma tardia ou juvenil, com início do quadro geralmente entre o terceiro e o quinto meses de vida¹.

A DB foi descrita em 1983 por Wolf et al. Trata-se de doença metabólica hereditária, com expressão fenotípica variada, na qual há defeito no metabolismo da biotina, vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo B². Nessa condição há deficiência da atividade da enzima biotinidase, que leva à depleção da biotina endógena, uma vez que a enzima é fundamental para a reciclagem da biotina no organismo, bem como para a utilização da biotina ligada à proteína fornecida pela dieta. Somente após a introdução do teste para DB na triagem neonatal é que se identificou a forma parcial da doença³.

Atualmente, a doença é classificada em dois subgrupos: deficiência total (DTB) e parcial (DPB), na qual a atividade sérica da enzima encontra-se respectivamente abaixo de 10% da atividade média normal e entre 10 e 30% da atividade média normal. O diagnóstico pode ser complementado com estudo do cDNA para detecção de mutações no gene biotinidase (BTD) localizado no braço curto do cromossomo 3(3p25)⁴. Até o momento há mais de 100 mutações descritas neste gene⁵.

Clinicamente, a forma clássica de DTB manifesta-se, em média, entre a sétima semana e o quinto mês de vida, podendo ocorrer mais precoce ou tardiamente. Entre os distúrbios neurológicos e cutâneos, destacam-se com mais frequência: as crises epiléticas, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, ataxia, hipotonia, alopecia e dermatite eczematoide. Distúrbios respiratórios, conjuntivite e infecções fúngicas, estas decorrentes, provavelmente, de disfunções imunorregulatórias, podem ocorrer com menos frequência. Alguns casos são fatais^{1,6}. As sequelas neurológicas em pacientes não tratados precocemente ou que iniciaram tratamento na fase sintomática e assim persistem apesar do tratamento consistem em distúrbios auditivos, visuais e atraso neuropsicomotor e de linguagem^{1,7-10}.

Normalmente, em alguns pacientes não tratados ocorrem alterações metabólicas, sendo as mais frequentes: cetoacidose, acidúria orgânica e hiperamonemia discreta ou moderada. Verificam-se também distúrbios decorrentes da deficiência secundária da

atividade de quatro carboxilases biotina-dependentes: acetil-CoA carboxilase, propionil-CoA carboxilase, piruvato-CoA carboxilase e β -metilcrotonil-CoA carboxilase, comprometendo, desta maneira, os processos da gliconeogênese, síntese de ácidos graxos e catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada¹¹.

O tratamento da DB, quando iniciado nos primeiros meses de vida, evita o aparecimento desses sintomas citados, além de ser muito simples e de baixo custo, pois consiste na reposição oral de biotina livre na dose de 05 a 20 mg, diariamente, por toda a vida^{12,13}.

A DB preenche alguns critérios para ser incluída na triagem neonatal, uma vez que os pacientes afetados não mostram sinais clínicos nesse período da vida. É doença com alta morbidade e que possui tratamento efetivo e de baixo custo.

No Brasil existem poucos estudos sobre a prevalência da DB, entre eles citam-se o de Pinto *et al.* (1995), realizado na cidade de Curitiba, no qual foram analisadas 125.000 amostras de sangue seco em papel-filtro (PF) de recém-nascidos (RNs) durante o Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN) do estado do Paraná, num período de oito meses, em que a prevalência combinada da DB foi de 1:62.500 nascidos vivos (NV)¹⁴. Em 2004, na cidade de Porto Alegre, Camargo Neto *et al.* conduziram um estudo privado, não populacional, durante período de quatro anos, em que houve colaboração de várias regiões do país, em 225.136 amostras de sangue seco em PF de RN, encontrando incidência combinada de DB estimada de 1:9.000 NVs¹⁵. Baseada em 36 programas de triagem neonatal para DB em 1990, numa amostra de 8.532.617 RN, a incidência mundial combinada de DB foi estimada em 1: 60.089 NVs (1:49.500 a 1:73.100), com intervalo de confiança (IC) de 95%¹⁶.

A prevalência da doença no estado de Minas Gerais não é conhecida e as investigações realizadas em outras regiões do nosso país mostram-se discordantes. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos determinar a prevalência da deficiência de biotinidase no estado de Minas Gerais, por meio de teste qualitativo de triagem realizado em amostras de RN avaliados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal, e avaliar e acompanhar clinicamente os indivíduos afetados.

4.2 Métodos

Realizou-se estudo transversal em 182.942 RNs participantes do (PETN-MG), no período de setembro de 2007 a junho de 2008. Posteriormente, procedeu-se a estudo prospectivo a partir dos casos identificados, nesta pesquisa, após instituído tratamento com biotina, durante período máximo de 16 meses. O tamanho da amostra foi baseado na literatura, tendo em vista que a incidência mundial mostrou as seguintes taxas: incidência combinada de DB 1: 60.089 NVs (1:49.500 a 1:73.100), DTB 1:112.271 NVs (1:85.000 a 1:145.000); DPB 1:129.282 NVs (1:112.700 a 1:177.000), com intervalo de confiança (IC) de 95%. A partir desses dados, inferiu-se que uma amostra de no mínimo 180.000 RNs seria suficiente para estimar a prevalência, levando-se em consideração que 1:177.000 foi o limite superior do intervalo de confiança da incidência estimada de DPB, que é superior ao da DTB.

Foram incluídos no estudo todos os RNs participantes do PETN-MG no período referido e excluídos todos os RNs cujos pais se recusaram a participar. Obteve-se dos pais assinatura do termo de consentimento simplificado e termo de consentimento esclarecido (APÊNDICE B). O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer ETIC 430/07) em 23/10/2007.

Foi utilizado o teste colorimétrico visual UMTEST BIOTINIDASA, desenvolvido em Cuba, um ultramicroensaio colorimétrico qualitativo que se baseia em medir a atividade da enzima biotinidase mediante a hidrólise do substrato artificial biotin-ácido p-aminobenzoico (B-PABA) em condições ótimas de potencial de Hidrogênio (pH) e temperatura, obtendo-se como produto o ácido p-aminobenzoico (PABA). A intensidade da cor obtida foi proporcional à atividade da enzima biotinidase presente na amostra. A bula fornecida pelo fabricante do teste informava sensibilidade e especificidade de 100%. Os procedimentos para a realização do teste foram os recomendados pelo fabricante.

A amostra de sangue foi obtida através de punção do calcanhar do RN e coletada em PF (*Schleicher & Shuell 903*), em média, entre o quinto e o sétimo dias de vida, de acordo com o procedimento padronizado pelo PETN-MG. Foi utilizada parte do material (sangue em PF), que é enviada rotineiramente ao Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (NUPAD/FM/UFMG) para realização dos demais testes de triagem neonatal. Nos casos em que o teste foi positivo ou indeterminado na primeira amostra realizada em duplicata, foi

solicitada e orientada a coleta de uma segunda amostra no próprio município, para confirmação do resultado do teste de triagem.

Os pacientes positivos foram classificados como suspeitos de deficiência total de biotinidase (DTB) ou de deficiência parcial de biotinidase (DPB), de acordo com a cor desenvolvida na amostra analisada, respectivamente, ausência de cor e cor púrpura clara. Todos foram convocados a comparecer ao Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM), onde foram submetidos à avaliação clínica e neurológica realizada pela pesquisadora, e ao laboratório do NUPAD/FM/UFGM, onde foram coletadas as amostras de sangue através de punção venosa para realização do teste quantitativo de biotinidase (padrão-ouro) baseado em leitura colorimétrica realizada em espectrofotômetro, que mede a liberação de p-aminobenzoato de N-biotinil-p-aminobenzoato descrito por Wolf *et al.* (1983)². Coletou-se de cada paciente aproximadamente 1,0 mL de sangue total em tubo seco. Em seguida, centrifugou-se e separou-se o sobrenadante (soro), que foi estocado em gelo seco a -80°C. Esse material foi enviado ao laboratório do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde o teste foi feito em 60% das vezes juntamente com amostra de um controle não relacionado com o probando e supostamente normal, coletada e estocada sob as mesmas condições especificadas. Os pacientes positivos foram classificados como afetados de DTB ou DPB, de acordo com o nível de biotinidase, respectivamente, inferior a 10% da atividade média normal (7,1 nmol de PABA liberado por minuto por mL de soro) e entre 10 e 30% da média.

Os pacientes cujas amostras foram negativas receberam alta. Os casos com DB confirmados pelo teste quantitativo foram reconvocados, juntamente com os pais, para uma segunda consulta no Ambulatório São Vicente do HC-UFGM, momento em que, além do exame clínico e neurológico da criança, foi prescrita biotina 10 mg para uso diário, via oral, que foi fornecida gratuitamente pelo NUPAD. Posteriormente à consulta, as crianças foram encaminhadas para realização de eletroencefalograma no setor de Neurofisiologia do HC-UFGM, com aquisição de traçado eletroencefalográfico, sem sedação, pelo período mínimo de 40 minutos. Foi utilizado eletroencefalógrafo da marca NIHON-KODEN, modelo analógico, com 10 canais, adotando-se as normas técnicas próprias para recém-nascido e lactente. Os pacientes foram avaliados mensalmente por pediatra do próprio município e trimestralmente por neuropediatra (pesquisadora) até o término da pesquisa; e continuarão sendo acompanhados, no Ambulatório de Neurogenética do HC-UFGM, aos cuidados da Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti (FIG. 1, APÊNDICE D).

Estimou-se a prevalência na população de RN no estado de Minas Gerais. Comparou-se o teste qualitativo e o quantitativo, tendo-se o último como padrão-ouro. Calcularam-se sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste UMTEST BIOTINIDASA após conhecerem-se os valores de falso-positivos e falso-negativos¹⁷.

Em relação à amostra total, as variáveis estudadas foram: a cobertura do programa; intervalo, em dias, decorrido entre a data de nascimento da criança e a realização da coleta da primeira amostra de PF; número de amostras do PF inadequadas bem como a frequência dos motivos da inadequação das mesmas; taxa de reconvocação considerando o número de RNs referidos para a segunda amostra de PF.

- Quanto aos 10 casos de DPB, as variáveis estudadas foram: intervalo entre o envio da amostra de PF e a chegada da mesma ao NUPAD/FM/UFMG; intervalo entre a chegada e a emissão dos resultados, idade do RN na liberação do resultado pelo laboratório; idade da confirmação diagnóstica, isto é, o resultado do teste quantitativo de biotinidase; dosagem de biotinidase dos casos e dos controles; idade da primeira consulta; idade de início do tratamento; tempo de acompanhamento; número de consultas. Os dados das fichas originais dos casos com DPB foram transferidos para o banco de dados pela pesquisadora responsável, foram preparados em planilhas e submetidos à análise descritiva com cálculo dos seguintes valores: média, mediana, máximo e mínimo e desvio-padrão para as variáveis numéricas contínuas e frequências absolutas e relativas para as variáveis categóricas. Os pacotes estatísticos utilizados para a análise dos dados foram SPSS 15®, *software* Excel®. Para a confecção dos gráficos, empregou-se o *software* R, versão 2.9.2, que é gratuito e está disponível no *site*: <http://www.r-project.org/>. Esse projeto foi desenvolvido pelo NUPAD/FM/UFMG.

4.3 Resultados

Dos 182.942 recém-nascidos (RNs) triados pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal em Minas Gerais (PETN-MG) no período de setembro de 2007 a junho de 2008 utilizando-se o método colorimétrico visual UMTEST-BIOTINIDASA, foram identificados 10 casos com deficiência parcial de biotinidase (DPB) e nenhum com deficiência total de biotinidase (DTB). Foram avaliadas 10 crianças, das quais nove foram acompanhadas clinicamente após a instituição de tratamento via oral com biotina 10 mg.

Uma transferiu-se para o estado de São Paulo e não foi acompanhada a partir do quarto mês do diagnóstico, porém manteve acompanhamento com neuropediatria local. Eletroencefalograma foi feito em nove crianças, previamente à instituição do tratamento.

4.3.1 A triagem neonatal

4.3.1.2 Prevalência de deficiência de biotinidase em Minas Gerais

Foram identificados 10 casos de DPB, neste estudo transversal, entre 182.942 RNs participantes do teste de triagem neonatal, resultando na taxa de prevalência de 1:18.289 nascidos vivos (NVs).

A média de idade no momento da coleta do papel-filtro (PF), observada em 182.942 RNs, foi de $6,9 \pm (2,83)$ dias, variando de um a 31 dias, sendo que em 75% dos RNs as amostras foram coletadas até o oitavo dia de vida. Entre os 10 casos de DPB, a média, mediana, desvio-padrão, máximo e mínimo entre a coleta e o recebimento do PF, entre o recebimento da amostra do PF e o resultado emitido pelo laboratório, a idade do RN na liberação do resultado pelo laboratório estão demonstrados na Tabela 1.

TABELA 1 - Estatísticas descritivas referentes à idade da coleta do PF e aos intervalos de tempo entre a coleta do PF até o resultado liberado pelo laboratório, referentes a 10 casos de DPB identificados pelo PETN-MG no período de setembro de 2007 a junho 2008

	Total*	Média	DP	Mediana	Máximo	Mínimo
Idade da coleta do PF (dias)	182.942	6,9	2,83	6	31	1
Intervalo C/R PF pelo lab. (dias)	10	5,6	2,46	5,50	11	3
Intervalo Rc/Rs PF pelo lab. (dias)	10	3	2	3	7	1
Idade do RN no resultado do PF pelo lab. (dias)	10	16,20	5,1	14,5	26	11

PF-papel-filtro, lab- laboratório, DP-desvio-padrão, C/R-coleta/recebimento, Rc/Rs-Recebimento/resultados, * pesquisado.

A cobertura do PETN-MG durante o período estudado foi de 94,8%. Das 182.942 amostras realizadas em duplicata, 1039 foram reconvocadas para realização da segunda amostra de PF. Os motivos da inadequação das amostras de PF estão distribuídos conforme Quadro 1.

QUADRO 1 - Motivos da inadequação das amostras de papel-filtro referentes à primeira coleta realizada durante a triagem neonatal para DB, no estado de Minas Gerais, no período de setembro de 2007 a junho de 2008

Índice	Motivo de inadequações das amostras em papel-filtro	Total de inadequações
1	Os cinco círculos não foram preenchidos	15
2	A área do(s) círculo(s) não foi(ram) totalmente preenchida(s)	1.059
3	Gota muito pequena, insuficiente para análise	196
4	Gota não penetrou totalmente no papel, não atingiu o verso	670
5	Múltiplas e pequenas gotas sobrepostas	2.999
6	Não houve eluição, sangue não se separou do papel	70
7	Amostra com aspecto de diluição do sangue	321
8	Amostra danificada	4
9	Amostra coletada antes do quinto dia	0
10	Amostra recebida com mais de 15 dias após a coleta	4
11	Outros	332
12	Houve desnaturação da hemoglobina	0
13	Criança recebeu transfusão de sangue	49

Fonte: UFMG/FM/NUPAD, 09/2007 a 10/08/2008.

As amostras em papel-filtro podem estar inadequadas por mais de um motivo, o que implica contá-las mais de uma vez.

Conforme pode ser observado na Figura 1, a taxa de reconvocação foi de 0,005, isto é, 1039 RNs entre 182.942 foram reconvocados para segunda coleta de sangue seco (PF), no próprio município de origem. O segundo cartão foi enviado por 1039 pacientes e 42 não o enviaram (abandono da pesquisa), resultando em 129 crianças suspeitas de serem afetadas pela DB. Esses pacientes foram convocados para avaliação clínica e neurológica no ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC–UFMG) e dosagem da enzima biotinidase pelo método quantitativo de Wolf no laboratório do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Compareceram à consulta 120 crianças e nove não compareceram. Essas nove ausências foram devidas, em quatro casos, a óbito do RN por motivos não identificados e em cinco casos à recusa familiar em comparecer à consulta (abandono da pesquisa), realizando a dosagem quantitativa de biotinidase em laboratório particular, cujos resultados nos foram enviados e foram normais, todas as ausências foram excluídas da amostra, conforme pode ser observado na Figura 1.

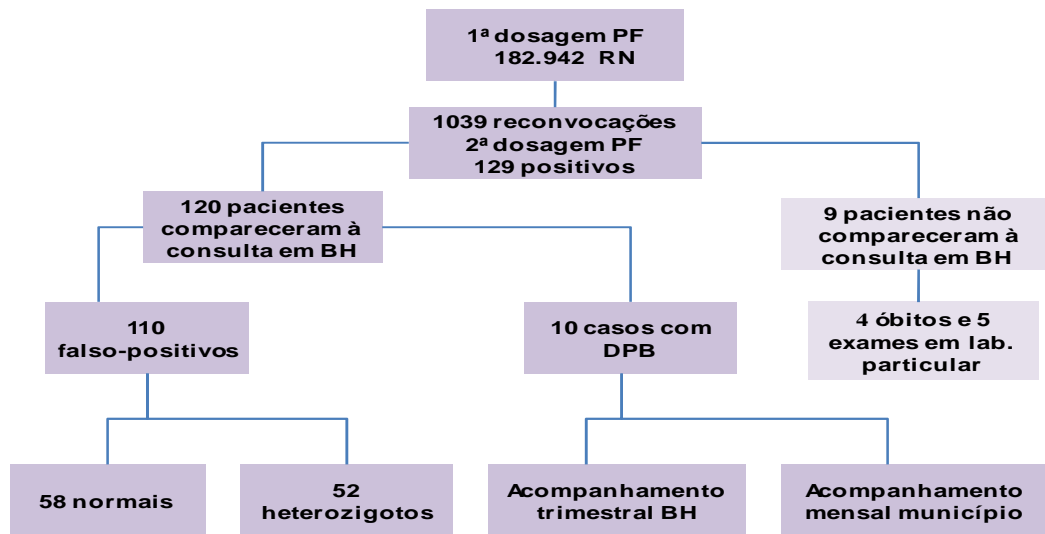


FIGURA 1 - Fluxograma mostrando 182.942 RNs triados para DB pelo PETN-MG, no período de setembro de 2007 a junho 2008, 1039 reconvoções para 2º cartão de PF, 120 resultados suspeitos e submetidos ao teste confirmatório para DB, 60% com controle concomitante; 10 casos de DPB, 110 falso-positivos.

pac -paciente; DPB - deficiência parcial de biotinidase.

Dos 120 pacientes suspeitos de DB que realizaram o teste quantitativo (padrão-ouro), 60% (72) fizeram dosagens de biotinidase juntamente com controles não relacionados, cujos valores variaram de 5,6 a 9,4 nmol/min/mL, todos na faixa da normalidade. Do total, 10 indivíduos resultaram afetados pela DPB. Os demais foram considerados falso-positivos, entre eles 47% (52) tinham níveis na faixa de heterozigotos e 53% (58) na faixa da normalidade, de acordo com as dosagens enzimáticas (Figura 1). Levando-se em consideração fatores que poderiam contribuir para resultados falso-positivos, 11 RNs foram acometidos de icterícia no período neonatal, não se conseguindo os valores de bilirrubina; a fototerapia foi realizada em três desses RNs; apenas sete prematuros puderam ser confirmados pelo cartão do RN, cuja média de idade gestacional foi de $33,71 \pm (2,3)$ semanas, variando de 29 a 36 semanas. Nenhum era portador de algum tipo de disfunção hepática, aparentemente, no momento da primeira consulta, quando foi coletada amostra sanguínea para dosagem quantitativa de biotinidase. Não foram identificados falso-negativos neste estudo, durante a triagem não houve desenvolvimento de reação colorimétrica compatível com a presença de substâncias cromogênicas.

O teste UMTEST BIOTINIDASA quando comparado com o teste quantitativo de Wolf (dosagem quantitativa enzimática de biotinidase), que foi considerado padrão-ouro neste estudo, apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 99,94% e falso-positivos de 0,06%. Verificou-se ausência de falso-negativos. O valor preditivo positivo (VPP) foi de 8,3% IC (4,3–15,2) e o valor preditivo negativo (VPN) foi de 100% IC (100–100). Para o cálculo de sensibilidade e especificidade, o tamanho da amostra foi corrigida para 182.891, devido às 51 exclusões (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2 - Resultados do teste colorimétrico UMTEST BIOTINIDASA em relação ao teste confirmatório para DB, referentes à triagem neonatal em 182.942 RNs realizada no estado de Minas Gerais, no período de setembro de 2007 a junho 2008

UMTEST BIOTINIDASA	Deficiência de Biotinidase		
	Sim	Não	Total
Teste positivo	10	110	120
Teste negativo	0	182.771	182.771
Total	10	182.881	182.891

TABELA 3 - Cálculos estatísticos comparando UMTEST BIOTINIDASA em relação ao teste confirmatório para DB, referentes à triagem neonatal, em 182.942 RNs, realizada no estado de Minas Gerais no período de setembro de 2007 a junho 2008

Taxa de reconvocação.....	1039 /182.942 = 0,005 ou 0,5%
Sensibilidade.....	10/10 = 1 ou 100%
Especificidade.....	182.771/182.891= 0,999 ou 99,9%
Falso-positivos.....	110/182.891 = 0,0006 ou 0,06%
Prevalência.....	10:182.891 = 1: 18.289
VPP.....	8,3 % IC (4,3–15,2)
VPN.....	100 % IC (100–100)

IC- intervalo de confiança, VPP- valor preditivo positivo, VPN-valor preditivo negativo.

4.5.2 Características clínicas e laboratoriais dos casos de DB

A Tabela 4 mostra cinco casos do gênero feminino e cinco do masculino, oito pacientes leucodermas e dois melanodermas e ausência de consanguinidade em todos eles.

TABELA 4 - Apresentação dos dados de 10 casos de DPB identificados pelo PETN do estado de Minas Gerais, no período de setembro de 2007 a junho 2008

Código	Consanguinidade	DN/gênero / cor da pele	Interpr. PF	Idade 1ª consulta dias	Resultado biotinidase nmol/min/mL (%)	Controle biotinidase	Situação Tto (mg/dia)
ARP/032781	Ausente	02/09/2007/ Masculino/ B	DPB	33	1,78 (25)	Não realizado	biotina (10)
PNG/003125	Ausente	12/09/2007/ Masculino/ N	DPB	48	1,50 (21)	8,70	biotina (10)
PIA/004597	Ausente	19/09/2007/ Feminino/ B	DPB	30	1,86 (26)	Não realizado	biotina (10)
IPP/002603	Ausente	08/12/2007/ Masculino/ B	DPB	39	2,20 (30) 1,80 (25)	8,10	biotina (10)
GUM/001087	Ausente	17/12/2007/ Feminino/ B	DPB	85	1,80 (25)	8,90	biotina (10)
SGQ/000728	Ausente	11/02/2008/ Feminino/ B	DPB	74	1,50 (21)	9,40	biotina (10)
PDI/000636	Ausente	25/01/2008/ Feminino/ B	DPB	68	1,80 (25)	Não realizado	biotina (10)
ALP/000136	Ausente	19/05/2008/ Masculino/ B	DPB	92	1,70 (23)	6,00	biotina (10)
IOG/000727	Ausente	26/05/2008/ Masculino/ N	DPB	240	1,78 (25)	Não realizado	biotina (10)
JAB/002321	Ausente	14/04/2008/ Masculino/ B	DPB	274	1,50 (21)	8,70	biotina (10)

Interp.-interpretação; B-branca; N-negra; Tto-tratamento, PF-papel-filtro, * = % da média normal de biotinidase 7,1 nmol /min/mL; substrato B-PABA. DN-data de nascimento

Os níveis séricos de biotinidase, primeiramente em nmol/min/mL e entre parênteses em porcentagem, da enzima biotinidase em relação à média normal informada pelo laboratório (7,1 nmol/min/mL), em que o substrato artificial utilizado foi o B-PABA nos 10 casos identificados de DPB representados pelos seus códigos, estão demonstrados na Tabela 4.

O paciente código IPP/002603 necessitou de duas dosagens quantitativas de biotinidase, devido ao resultado inicial 2,2 nmol/min/mL muito próximo do limite do ponto de corte de 2,1 nmol/min/mL. Optou-se, então, por repetir a dosagem, que foi de 1,8 nmol/mL/min (Tabela 4).

A média da atividade de biotinidase em nmol/mL/min, nos 10 casos de DPB, foi de $1,67 \pm (0,15)$. No grupo-controle a média foi de $8,22 \pm (1,18)$, conforme a Tabela 5. A comparação dos níveis de biotinidase entre os casos e os controles encontra-se no Gráfico 1.

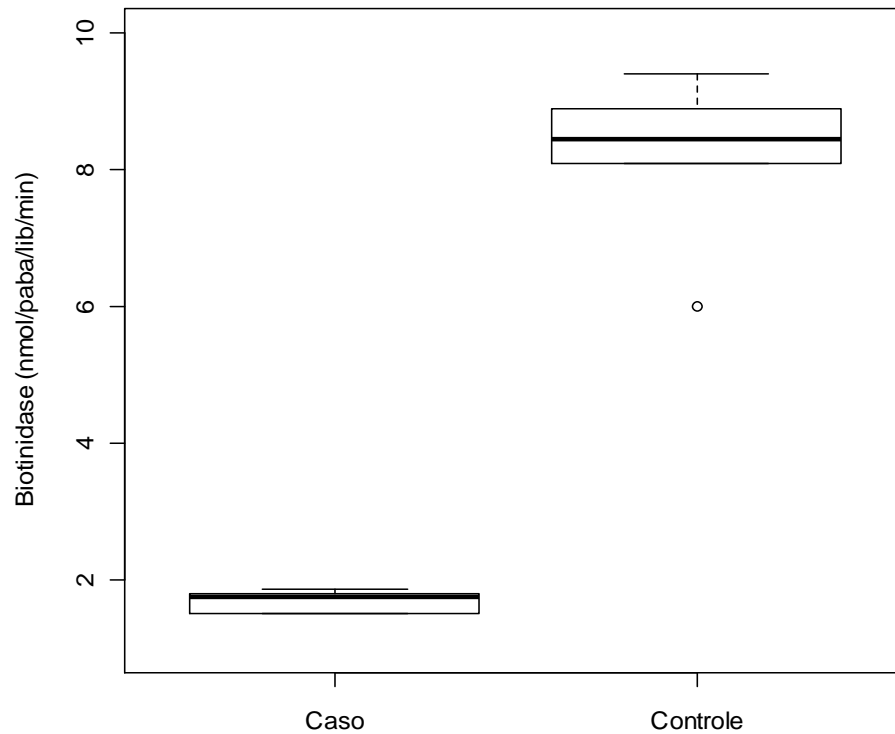


GRÁFICO 1 - Comparação dos níveis de biotinidase entre os casos e os controles (à esquerda) referentes aos 10 casos de DPB identificados pelo PETN-MG no período de setembro de 2007 a junho 2008.

Obs: substrato utilizado B-PABA.

TABELA 5 - Estatísticas descritivas referentes a 10 casos de DPB identificados pelo PETN-MG no período de setembro de 2007 a junho 2008

	Média	DP	Mediana	Máximo	Mínimo
¹ Atividade de biotinidase (AB)*	1,67	0,15	1,74	1,86	1,50
² AB* controle	8,22	1,18	8,45	9	6
¹ Primeira consulta (dias)	100	97,5	71	285	30
¹ Idade de início do tto (dias)	154	82	135	300	60
¹ Confirmação diagnóstico (dias)	121	78	103	258	38
¹ Tempo seguimento (meses)	9	4,5	8,5	16	4
¹ Número de consultas	4	1,3	3,5	6	3

*nmol/min/mL, substrato B-PABA; PF-papel-filtro; ¹ n-10; ² n-6; DP-desvio-padrão; tto-tratamento.

O primeiro atendimento médico aos casos de DPB para avaliação clínica e coleta de sangue para dosagem quantitativa de biotinidase foi, em média, de $100 \pm (97,5)$ dias, mediana de 71 dias, que variou de 30 a 285 dias. Como pode ser observado na Tabela 4 acima, os pacientes códigos IOG/000727 e JAB/002321 foram enviados pelo município de origem para primeira consulta mais tardiamente que os outros casos, atrasando, conseqüentemente todos os subseqüentes procedimentos. A idade da confirmação diagnóstica foi, em média, de $121 \pm (78)$ dias, mediana de 103 dias, variando de 38 a 258 dias. A idade de início do tratamento foi, em média, de $154 \pm (82)$ dias e variou de 60 a 300 dias. O tempo de seguimento foi, em média, de $9 \pm (4,5)$ meses, variando de quatro a 16 meses (Tabela 5).

Todos os pacientes apresentaram avaliação clínica e neurológica normais previamente à instituição do tratamento.

Todos os casos de DPB receberam tratamento com biotina 10 mg/dia, via oral, medicação que foi fornecida gratuitamente pelo NUPAD. Apenas um paciente, código PNG/003125, necessitou mudar de estado, porém continuou tratamento com neuropediatra local. Apesar de várias tentativas, não foi conseguido mais contato com a família. Todos os outros nove casos foram reavaliados trimestralmente por neuropediatra (pesquisadora) e mantiveram-se clínica e neurologicamente normais. A média do número de consultas foi de $4 \pm (1,3)$ e variou de três a seis, mas o número mínimo de três consultas foi registrado em quatro pacientes: código ARP/0032781, que mudou de estado; código PDI/00636, que faltou à última consulta, porém a família informou que estava recebendo a medicação pelo

correio e a paciente encontrava-se com adequado desenvolvimento; e os dois referidos previamente, códigos IOG/00727 e JAB/002321.

Foram submetidos nove casos à realização de eletroencefalograma previamente ao tratamento, todos com resultados normais. Um paciente, código IPP/002603, não conseguiu realizar o exame, por questões técnicas.

4.4 Discussão

4.4.1 Triagem neonatal

4.4.1.1 Prevalência de deficiência de biotinidase em Minas Gerais

A prevalência de deficiência de biotinidase (DB) em Minas Gerais, estimada neste estudo, foi de um caso para cada 18.289 nascidos vivos (NVs) e todos os identificados apresentavam deficiência parcial de biotinidase (DPB). As taxas de prevalência descritas na literatura são variáveis. A incidência mundial, baseada em 36 programas de triagem neonatal para DB em 1990, numa amostra de 8.532.617 recém-nascidos (RNs), mostrou as seguintes taxas: DTB 1:112.271 NVs (1:85.000 a 1:145.000); DPB 1:129.282 NVs (1:112.700 a 1:177.000); e a incidência combinada de DB foi de 1: 60.089 NVs (1:49.500 a 1:73.100). Dados publicados em 2007 referentes à triagem neonatal em nove países europeus, numa amostra de 1.321.989 RNs, mostram prevalência combinada de DB de 1:47.486¹⁸.

Percebe-se que a prevalência, no presente estudo, é superior à mundial e à descrita em alguns países europeus. Por outro lado, estudos-pilotos de triagem neonatal em regiões isoladas mostram prevalência mais alta, tais como: em 1989, observou-se em Quebec, entre 163.000 RNs, prevalência combinada de DB de 1:10.866 NVs e DPB 1:13.583 NVs¹³; em 1992, entre 99.398 RNs, em estudo conduzido durante um ano em Massachusetts, foram encontrados os seguintes valores: DTB 1:33.000 NVs e DPB 1:14.000 NVs^{18,19}. Mais recentemente, um estudo conduzido a partir da triagem neonatal em Minnesota realçou incidência combinada de DB de 1:8.540 NVs, DPB 1:10.181 NVs e DTB 1:52.945 NVs⁵. Destaca-se que países onde a consanguinidade é elevada apresentam taxas de prevalência mais altas, como 1:11.614 NVs, observada num estudo conduzido na Turquia²⁰.

Quanto aos estudos nacionais, os dados de prevalência são discordantes, com taxas que variam de prevalência combinada de DB de 1:62.500 NVs, DTB, 1:121.000 NVs; DPB, 1:121.000 NVs¹⁴ a taxas mais altas¹⁵, de 1:9.000 NVs; 1:14.192 NVs e 1:9.000 NVs. Ainda, em 2009, avaliação de 20.529 RNs rastreados pelo PETN no estado do Paraná, de setembro 2001 a 2006, na cidade de Maringá, salientou três casos de DB, com prevalência combinada de 1:6.843, porém nesse estudo não há referência aos tipos de DB, consanguinidade e se os casos poderiam ser relacionados.²¹ A taxa de prevalência do presente trabalho obteve valor intermediário entre os demais estudos nacionais citados, enfatizando possível variação regional e sinalizando para a importância de estudos locais, especialmente em um país tão extenso quanto o Brasil.

O fato de nenhum caso de DTB ter sido detectado na presente pesquisa pode estar relacionado ao tamanho da amostra, à variação na frequência das diferentes mutações, o que refletiria possível diferença na prevalência das formas da DB. Outro fator que deve ser considerado são as exclusões, apesar de terem sido bem inferiores às dos demais estudos nacionais^{13,22}.

A cobertura do PETN-MG foi de 94,8% em relação aos NVs, no período estudado. Uma parcela da população ter realizado o exame de triagem em laboratórios privados, a coleta do PF não ser realizada nos finais de semana, em postos de saúde, podem ter interferido nesse resultado. Essa taxa encontra-se aquém do objetivo preconizado mundialmente para um programa de triagem neonatal, que deve ser o mais próximo de 100%, porém se mostrou muito melhor que a média nacional, de 89,2%, observada nos serviços de referência para triagem neonatal, em 2005²³. Quando comparado a outros países latino-americanos, nota-se que esta é uma ótima taxa de cobertura, ficando aquém somente de alguns países que apresentam cobertura em torno de 100%, entre os quais se citam: Cuba, Chile, Costa Rica e Uruguai, porém melhor que em outros cujas taxas se mostram bem inferiores, tais como Argentina (64%) e México (70%)²⁴.

A média de idade para a coleta do sangue seco em PF, no presente estudo, foi de 6,9 dias, sendo que em 75% dos RNs as amostras foram coletadas até o oitavo dia de vida. Esse valor encontra-se muito próximo dos preconizados como ideais (três a sete dias) pelo Ministério da Saúde (Portaria nº 822)²⁵. Camargo Neto *et al.* (2004) referem que a média da idade para a coleta do PF foi de 13 dias¹⁵.

Na atual pesquisa, o programa de triagem atingiu sua meta, coletando a maioria das amostras na época recomendada, entre o quinto e o sétimo dias de vida, que pode ser explicado por haver um serviço único e bem organizado de referência como executor da

triagem neonatal para todo o estado de Minas Gerais, abrangendo todos os 853 municípios. As amostras dos 10 casos de DPB chegaram ao laboratório em tempo hábil, com média de 5,5 dias. Os resultados foram liberados rapidamente, com média de três dias, inferior ao estabelecido pelo Ministério da Saúde (cinco dias úteis), atingindo um dos principais objetivos para um programa adequado de triagem neonatal²⁵.

Entre os 10 casos de DB, a média e a mediana da idade para confirmação diagnóstica, observada foi respectivamente de 121 e 103 dias superior ao encontrado em 2004 por Weber & Baumgartner, cuja idade média foi de 11 dias (variando de cinco a 42 dias, com mediana de oito dias)²⁶. Em contrapartida, na Turquia foi referenciada idade média de $21,9 \pm 14,2$ dias²⁰. Em muitos programas de triagem neonatal, o diagnóstico é confirmado antes de um mês de idade, porém, em outros, leva meses para ser feito²².

Na literatura não existe homogeneidade quanto à definição de taxa de reconvocação. Na atual pesquisa, quando se considerou a reconvocação (o número de crianças submetidas a uma segunda análise qualitativa em PF), encontrou-se taxa elevada de 0,5%, valor que está acima das taxas descritas tanto em estudos nacionais como internacionais. Entre os trabalhos nacionais, cita-se a taxa de 0,17%¹⁴. Em relação aos estudos internacionais, na Virgínia, 1984, a taxa mencionada foi de 0,09%²⁸. No entanto, quando a taxa de reconvocação considerou o número de crianças referidas para confirmação diagnóstica, de acordo com o estudo de Loeber em 2007, obteve-se o valor de 0,07%. Ressalta-se que essa taxa mostrou-se mais próxima daquelas encontradas em alguns países europeus, incluídos na revisão de Loeber¹⁸.

Assim como descrito na literatura, acredita-se que os principais fatores que contribuíram para essa elevada taxa de reconvocação na atual pesquisa foram os problemas técnicos inerentes à coleta inadequada das amostras sanguíneas do PF^{12,14,15}. Entre as três causas mais frequentes, citam-se, em ordem decrescente: a) a área do(s) círculo(s) do PF não foi(ram) totalmente preenchida(s); b) múltiplas e pequenas gotas sobrepostas; c) a gota de sangue não penetrou totalmente no PF, não atingindo o verso. Outro aspecto que interferiu na reconvocação foi a metodologia utilizada¹⁸, pois quando se utiliza um método qualitativo visual, alguns trabalhos consideram apenas a ausência de cor, enquanto outros salientam também a cor púrpura clara.

A prevalência de DPB, segundo Wolf, durante estudo de triagem neonatal mundial, podia estar subestimada, tendo em vista que alguns projetos-pilotos incluem como amostras alteradas apenas o padrão visual ausência de coloração²². Ressalta-se que o teste UMTEST BIOTINIDASA utilizado na presente pesquisa é um método qualitativo visual,

diferentemente do descrito por Heard, que é semiquantitativo. O *kit* contém controles da reação para deficiência total (ausência de cor) e para atividade normal de biotinidase (cor púrpura). Não é fornecido controle para a DPB, que deve ser suspeitada quando a cor da reação for púrpura clara, que é um dado subjetivo e examinador-dependente. Optou-se, aqui, por repetir toda amostra que apresentasse cor mais clara que o controle normal. Acredita-se que isso tenha influenciado diretamente na taxa de reconvocação.

A adesão no envio do segundo cartão de PF foi de 98,9%, valor inferior aos encontrados por Pinto (70%)¹⁴ e por Wolf e Heard (93,3%)²². Tal diferença se deve a toda a infraestrutura disponibilizada pelo NUPAD/FM/UFMG, que é responsável por várias ações associadas ao sucesso do programa de triagem neonatal, como: treinamento de profissionais de saúde envolvidos no programa, busca ativa de crianças suspeitas das doenças testadas, ação junto às secretarias municipais de saúde para garantir transporte para as crianças em tratamento, agendamento das consultas especializadas, recepção e acompanhamento das crianças e familiares durante as consultas e exames.

Dos 120 pacientes em que foi realizada dosagem quantitativa da atividade de biotinidase, 60% foram realizados com dosagem de controles concomitantes, cujos valores encontraram-se na faixa da normalidade, proporcionando mais confiabilidade aos resultados obtidos, conforme sugerido por Wolf e Heard²². A partir do momento em que se percebeu que as amostras estavam sendo acondicionadas de forma adequada, deixou-se de realizar o controle concomitante, por motivos financeiros. Na bibliografia consultada não foi encontrada metodologia semelhante a esta realizada durante estudos de triagem neonatal.

Dos pacientes que foram considerados falso-positivos, 47% (52) tinham atividade de biotinidase na faixa de heterozigotos e 53% (58) na faixa de normalidade. Esses dados não foram informados nos estudos nacionais. Wolf e Heard acentuam frequência estimada de heterozigose de 1:123²². Na presente investigação, procurou-se identificar os fatores que poderiam contribuir com resultados falso-positivos, tais como icterícia²⁹ e prematuridade, quando pode ocorrer deficiência transitória de biotinidase^{30,31}. Encontraram-se 11 RNs que tiveram icterícia no período neonatal e sete prematuros com idade gestacional inferior a 36 semanas. Diferentemente do estudo conduzido por Pinto *et al*¹⁴, conseguiram-se as informações sobre prematuridade e icterícia no cartão de nascimento da criança, durante a primeira consulta dos pacientes suspeitos de serem afetados pela DB, previamente à confirmação do diagnóstico, nesta pesquisa.

O teste UMTEST BIOTINIDASA comparado com padrão-ouro (dosagem quantitativa de biotinidase) apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 99,96%, concordante com a maioria dos outros testes referidos na literatura nacional^{14,15} e internacional^{28,30,32,33}.

No presente estudo, os falso-positivos de 0,06% não podem ser comparados aos de Pinto¹⁴ e Heard *et al.*³², que utilizaram o segundo cartão de PF como padrão-ouro. Em relação ao estudo de Camargo Neto¹⁵, não há referência de como foram calculados os falso-positivos. Não foram identificados falso-negativos concordantes com a literatura nacional e internacional consultada^{14,15,22,30,32}. Entre os fatores que interferem no método colorimétrico realizado no PF resultando em falso-negativos, destacam-se as sulfonamidas e a procaína ou benzilpenicilina. Tais fármacos administrados à mãe no período pré-parto ou ao RN logo após o nascimento podem desenvolver cor, mesmo na ausência da enzima²⁸. No entanto, em nossos casos, durante a triagem, não houve desenvolvimento de reação colorimétrica compatível com a presença dessas substâncias cromogênicas.

4.4.1.2 Características clínicas e laboratoriais

A atividade de biotinidase igual à do adulto é atingida aproximadamente com um mês de idade³. Todos os sujeitos do presente estudo tinham idade superior à referida, no momento da dosagem quantitativa. A média dos valores quantitativos de biotinidase foi de $1,67 \pm (0,15)$ nmol/min/mL (23,3%), variando de 1,5 a 1,86 nmol/min/mL (21 a 26%), utilizando-se o substrato artificial B-PABA, concordante com os valores encontrados na literatura^{3,13,20,22,34-36}.

O paciente código IPP/002603 foi submetido a duas dosagens quantitativas de biotinidase. O resultado inicial revelou atividade de 2,2 nmol/min/mL, muito próximo do limite do ponto de corte de 2,1 nmol/min/mL. Como tal amostra havia sido encaminhada sem controle, optou-se por realizar uma segunda dosagem, que mostrou valor de 1,8 nmol/min/mL, sendo o do controle de 8,10 nmol/min/mL (faixa da normalidade). Quando várias determinações enzimáticas séricas são efetuadas e mostram valores diferentes, a atividade mais elevada é mais representativa do verdadeiro genótipo do paciente. Apesar disso, devido à proximidade do resultado mais elevado ao ponto de corte, escolheu-se, em um primeiro momento, iniciar o tratamento e acompanhar clinicamente essa criança. Estudos moleculares futuros poderão ser úteis e definitivos na decisão de continuar ou não

o tratamento neste caso, devido a possível variabilidade nos níveis de atividade da biotinidase entre pacientes com DB, conforme observado por Camargo Neto *et al.*¹⁵.

Em relação ao gênero, não existiu predomínio entre os sexos. Quanto à cor da pele, 80% eram leucodermas e 20% melanodermas. No estudo conduzido por Wolf e Heard, a maioria das crianças identificadas eram leucodermas. Em países orientais, a frequência da DB é muito baixa²².

No presente estudo notou-se ausência de consanguinidade entre os pais dos afetados de DB, assim como descrito em dois outros estudos nacionais e alguns internacionais^{5,22,37}.

O primeiro atendimento médico a casos suspeitos de deficiência de biotinidase foi, em média, de 100 dias, mediana de 71 dias e variou de 30 a 285 dias. Os fatores que contribuíram para esse atraso foram: a demora de alguns municípios para enviar o segundo cartão de PF e de encaminhar o paciente para coleta de sangue para realização do teste confirmatório, como ocorreu com os pacientes códigos IOG/000727 e JAB/002321. Eles foram diagnosticados mais tardiamente, apesar de todos os esforços feitos pelo NUPAD na busca ativa. Verificou-se que 80% das crianças realizaram essa avaliação até 92 dias de vida. Não se encontrou na literatura consultada relato semelhante no que diz respeito ao atendimento médico previamente à confirmação diagnóstica.

Todos os pacientes apresentavam avaliação clínica e neurológica normais no momento da confirmação diagnóstica, em consonância com a maioria das publicações consultadas^{3,5,14,22}. Ao contrário, pesquisa feita na Hungria entre 1989 e 2001 revelou que sete crianças diagnosticadas com DPB exibiam sintomas discretos no momento do diagnóstico, descritos como hipotonia e dermatite em face. Tais sintomas, apesar de discretos, foram responsivos ao tratamento com biotina²⁷.

A mediana para início do tratamento foi de 135 dias e variou de 60 a 300 dias, acima dos valores referidos na literatura^{14,38}. Para alguns autores, a idade média do início da biotina foi de 40 dias de vida (variou de 10 a 158 dias, mediana de 23 dias)²⁶ e de duas semanas de vida⁵. Além dos fatores previamente citados, que contribuíram para o atraso na realização da primeira consulta, a greve dos correios, que ocorreu em dois momentos da pesquisa, também contribuiu para o atraso na confirmação diagnóstica e consequente início de tratamento, tendo em vista que o teste confirmatório foi terceirizado e realizado em outro estado. No presente trabalho, a primeira consulta dos casos suspeitos realizada antes da confirmação do diagnóstico foi uma medida importante, porque permitiu constatar-se a ausência de sintomatologia nos casos identificados, ressaltando-se que 80% dos pacientes

havia sido avaliados clinicamente até o terceiro mês de vida. Isso foi fundamental para tranquilizar e esclarecer as dúvidas das famílias quanto ao tratamento e possível prognóstico, tendo em vista o atraso ocorrido para confirmação diagnóstica e consequente início de tratamento.

O tratamento foi realizado com biotina 10 mg, dentro da faixa recomendada, entre 5 e 20 mg, via oral diariamente^{11,12}. Há controvérsias sobre o tratamento de pacientes com DPB. Alguns investigadores optaram por tratar os pacientes com DPB identificados em programas de triagem neonatal^{3,5}, assim como em alguns estudos nacionais^{5,14,15}. Outros, ao contrário, na Áustria³⁷ e nos EUA¹⁹, não trataram os casos de DPB.

Apesar da evidência de que muitos pacientes com DPB permanecem assintomáticos durante estudos de seguimento de longo prazo, observam-se alguns relatos na literatura de pacientes que apresentaram alguma sintomatologia que foi responsiva ao tratamento com biotina, como: uma criança, identificada durante a triagem neonatal, com 30% da média da atividade de biotinidase, desenvolveu quadro de hipotonia e perda de cabelo em região occipital e dermatite perioral durante um episódio de gastroenterite. Foi tratada com 10 mg de biotina oral diariamente e após um ano de tratamento o exame clínico mostrava-se normal³. Outro paciente com DPB diagnosticada durante a triagem neonatal apresentava distúrbio de linguagem, dermatite perioral e vômitos durante quadros infecciosos³⁶. Na Hungria, sete crianças diagnosticadas com DPB exibiam sintomas discretos no momento do diagnóstico, os quais se resolveram após início do tratamento com biotina²⁷. Deve-se considerar, ainda, que as reais consequências de uma deficiência marginal de biotina quando associada a outros fatores desencadeantes não foram totalmente elucidadas, podendo o cérebro ser um dos primeiros órgãos atingidos. Segundo Wolf, o ideal é que os pacientes com DPB sejam monitorados de perto para se determinar a necessidade e o momento de se iniciar a suplementação com biotina. Enfatiza-se, também, a possibilidade de definir essa conduta juntamente com os pais após esclarecimento sobre as implicações de tratar ou não DPB¹¹. Diante das dificuldades e incertezas sobre a possibilidade de se fazer acompanhamento mais próximo, optou-se por tratar os pacientes com a doença³.

O número médio de consultas de foi de $4 \pm (1,3)$, variando de três a seis consultas. Ao término desta pesquisa, pôde-se constatar que nenhum paciente apresentou anormalidades em seu desenvolvimento clínico e/ou neurológico. O tempo de seguimento foi, em média, de nove meses, variando de quatro a 16 meses, próximo dos valores encontrados em estudo de triagem neonatal realizado em Quebec, em que a média de tempo do seguimento de 12 casos identificados com DPB foi de 13 meses, variando de três

a 22 meses¹³. Também a evolução clínica monitorada por meio de contato telefônico com pais e médicos das crianças, em estudo conduzido em Porto Alegre, apresentou-se normal e, segundo os autores, elas permaneceram assintomáticas durante o período da pesquisa¹⁵. Os fatores que concorreram para a variabilidade entre menos número de consultas e tempo de seguimento dos pacientes, no presente estudo, foram os mesmos citados previamente para confirmação diagnóstica e início de tratamento.

Dos dez pacientes com DPB, nove foram submetidos à realização de eletroencefalograma (EEG) previamente ao tratamento, todos com traçados eletroencefalográficos normais. Na bibliografia consultada, foram encontradas poucas referências a respeito da realização de EEG em pacientes com DB. Em uma delas os autores relataram a realização de EEG em alguns pacientes identificados pela triagem neonatal, porém não especificaram o número de pacientes nem os resultados encontrados¹³. Em outra, foram normais os EEGs de quatro casos com DTB, que apresentaram sintomas discretos, apesar do tratamento com biotina²⁷. Após estudo conduzido em 1993, concluiu-se serem necessários futuros estudos de anormalidades eletroencefalográficas em deficiência de biotinidase³⁸.

4.5 Conclusão

O presente estudo revelou prevalência de DB de 1:18.289 NVs no estado de Minas Gerais, mais alta que a encontrada na maioria dos outros países. O teste colorimétrico visual UMTEST BIOTINIDASA foi considerado efetivo em identificar os casos de DB. Todos os pacientes identificados apresentavam DPB, o que sugere possível diferença regional na frequência do gene da biotinidase. Todos os casos foram assintomáticos previamente ao tratamento e assim permaneceram até o término da pesquisa. Os EEGs realizados em nove casos de DPB previamente à instituição do tratamento foram normais.

O teste colorimétrico visual UMTEST BIOTINIDASA foi considerado efetivo em rastrear os casos de DB. O fato de ter sido um estudo-piloto, no qual o teste foi utilizado pela primeira vez associado à falta de controle para DPB no *kit*, pode ter contribuído para as altas taxas de reconvocação e de falso-positivos no presente estudo.

A alta taxa de reconvocação para o segundo cartão, devido ao elevado número de amostras inadequadas, valor acima de outros estudos referidos na literatura, sugere que a equipe que coleta as amostras de PF necessita estar em constante treinamento, principalmente quando há muita rotatividade desses profissionais. Outro fator que interfere

na reconvocação é a metodologia utilizada, pois quando se utiliza um procedimento qualitativo visual, alguns trabalhos consideram apenas a ausência de cor, enquanto outros consideram também a cor púrpura clara.

A elevada adesão pelos pacientes no envio do segundo cartão de PF, na atual pesquisa, indica que os programas estaduais de triagem neonatal devem investir em infraestrutura, material humano e busca ativa, a exemplo do que ocorre no NUPAD/UFG.

Referências

1. Baumgartner ER. & Suormala T. Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism. *Int J Vitam Nutr Res* 1997; 67(5):377-84.
2. Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL, Parker WD. *et al.* Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *J Pediatr* 1983; 103(2):233-7.
3. Mcvoy JR, Levy HL, Lawler M, Schmidt MA, Ebers DD, Hart PS. *et al.* Partial biotinidase deficiency: clinical and biochemical features. *J Pediatr* 1990; 116(1):78-83.
4. Cole H, Reynolds TR, Lockyer JM, Buck GA, Denson T, Spence JE., *et al.* Human serum biotinidase. cDNA cloning, sequence, and characterization. *J Biol Chem* 1994; 269(9):6566-70.
5. Sarafoglou K, Bentler K, Gaviglio A, Redlinger-Grosse K, Anderson C, Mccann M. *et al.* High incidence of profound biotinidase deficiency detected in newborn screening blood spots in the Somalian population in Minnesota. *J Inherit Metab Dis* 2009; 7.
6. Nyhan WL. Inborn errors of biotin metabolism. *Arch Dermatol* 1987; 123(12):1696-8a.
7. Salbert BA, Astruc JE, Wolf B. Ophthalmologic findings in biotinidase deficiency. *Ophthalmologica* 1993; 206(4):177-81. 1993.
8. Wastell HJ, Bartlett K, Dale G, Shein A. Biotinidase deficiency: a survey of 10 cases. *Arch Dis Child* 1988; 63:1244-49.
9. Wolf B, Spencer R, Gleason T. Hearing loss is a common feature of symptomatic children with profound biotinidase deficiency. *J Pediatr* 2002; 140(2):242-6.
10. Genc GA, Sivri-Kalkanoglu H S, Dursun A, Aydin HI, Tokatli A, Sennaroglu L. *et al.* Audiologic findings in children with biotinidase deficiency in Turkey. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71(2):333-9.
11. Wolf B. Disorders of biotin metabolism. *In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic & molecular bases of inherited disease. 8th edition. New York: McGraw-Hill Co, 2001; 3935-62.*

12. Wolf B. Biotinidase deficiency: new directions and practical concerns. *Curr Treat Options Neurol* 2003; 5(4):321-8.
13. Dunkel G, Scriver CR, Clow CL, Melancon S, Lemieux B, Grenier A. *et al.* Prospective ascertainment of complete and partial serum biotinidase deficiency in the newborn. *J Inherit Metab Dis* 1989; 12(2):131-8.
14. Pinto ALR. Estudo de prevalência em recém-nascidos por deficiência de biotinidase. 1995. 75f. Dissertação (Mestrado Área de Concentração: Neurologia) Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
15. Camargo Neto EC, Rubim R, Lewis E, Demari J, Castilhos C, Brites A. *et al.* Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(3):295-9.
16. Wolf B. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1991; 14:923-27.
17. Fletcher RH. & Fletcher SW. *Epidemiologia clínica: elementos essenciais*. 4. edição, Porto Alegre: Artmed. reimpressão 2008: 56-97. 2006.
18. Loeber JG. Neonatal screening in Europe: the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30(4):430-8.
19. Lawler MG, Frederick DL, Anza SR, Wolf B, Levy HL. Newborn screening for biotinidase deficiency: pilot study and follow-up of identified cases. *Screening* 1992; 1(1):37-47.
20. Baykal T, Huner G, Sarbat G, Demirkol M. Incidence of biotinidase deficiency in Turkish newborns. *Acta Paediatr* 1998; 87(10):1102-3.
21. Luz GS, Pelloso SM, Higarashi I. Prevalência das doenças diagnosticadas pelo programa de triagem neonatal em Maringá, Paraná, Brasil 2001-2006. *Rev Gaucha Enferm* 2008; 29(3):446-53.
22. Wolf BE. & Heard GS. Screening for biotinidase deficiency in newborns: worldwide experience. *Pediatrics* 1990; 85(4):512-7.
23. Carvalho TM, Santos HP, Vargas PR; Pedrosa J. Newborn screening :a national public health programme in Brazil. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30(x):615.
24. Borrajo GJC. Newborn screening in Latin America at the beginning of the 21st century *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2007; 30(4):466-81.
25. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 822, de 06 de junho de 2001. Disponível em: [<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2001/GM/GM-822.htm>]. Acessado em 07/11/2009.
26. Weber PS. & Baumgartner ER. Outcome in patients with profound biotinidase deficiency: relevance of newborn screening. *Dev Med Child Neurol* 2004; 46(7):481-4.

27. László A, Sallay E, Endreffy E, Somogyi C, Várkonyi A, Havass Z. *et al.* Neonatal screening for biotinidase deficiency in Hungary: clinical, biochemical and molecular studies. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26(7):693-8
28. Heard GS, Mcvoy JR, Wolf B. A screening method for biotinidase deficiency in newborns. *Clin Chem* 1984; 30(1):125-7.
29. Schulpis KH, Tjamouranis J, Karikas GA, Kapiki A, Costalos C. The effect of neonatal jaundice on biotinidase activity. *Early Hum Dev* 2003; 72(1):15-24.
30. Suormala T, Wick H, Baumgartner ER. Low biotinidase activity in plasma of some preterm infants: possible source of false-positive screening results. *Eur J Pediatr* 1988; 147(5):478-80.
31. Pinto ALR. Comportamento da biotinidase em prematuros: Influência da idade gestacional. 1999. 75f. Tese (Doutorado, Área de Concentração: Neurologia) Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
32. Heard GS, Wolf B, Jefferson LG, Weissbecker KA, Nance WE, Mcvoy JR. *et al.* Neonatal screening for biotinidase deficiency: results of a 1-year pilot study. *J Pediatr* 1986; 108(1):40-6.
33. Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* 1983; 131(3):273-81.
34. 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. *Hum Genet* 1998; 102(5):571-5.
35. Baykal TG, Gokdemir Y, Demir F, Seckin Y, Demirkol M, Jensen K. *et al.* Asymptomatic adults and older siblings with biotinidase deficiency ascertained by family studies of index cases. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28(6):903-12.
36. Funghini S, Donati MA, Pasquini E, Gasperini S, Ciani F, Morrone A. *et al.* Two new mutations in children affected by partial biotinidase deficiency ascertained by newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2002; 25(4):328-30.
37. Muhl A, Moslinger D, Item CB, Stockler-Ipsiroglu S. Molecular characterisation of 34 patients with biotinidase deficiency ascertained by newborn screening and family investigation. *Eur J Hum Genet* 2001; 9(4):237-43.
38. Salbert BA, Pellock JM, Wolf B. Characterization of seizures associated with biotinidase deficiency. *Neurology* 1993; 43(7):1351-5.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência de DB de 1:18.289 NVs, observada no presente estudo, reforça os achados encontrados por Camargo Neto *et al.* (2004) no estudo privado realizado em Porto Alegre, sugerindo que no Brasil a prevalência pode ser mais alta que em outros países. A ausência de casos com DTB, nesta pesquisa, pode ser decorrente de possível diferença regional na frequência de mutações associadas a esse fenótipo e do tamanho da amostra que incluiu o número mínimo de RN(s) considerado suficiente para a atual pesquisa.

Wolf e Heard (1990) sugerem que cada estado, região ou país decida se a triagem da DB deve ser incorporada ao programa já existente, baseados nas vantagens da triagem neonatal, na incidência da doença e na disponibilidade de recursos.

Vários fatores devem ser considerados ao se avaliar a inclusão do teste de triagem neonatal para a DB, tais como: o baixo custo de incorporar mais uma doença à triagem neonatal já estabelecida para outras doenças, o baixo custo do tratamento, a dificuldade de reconhecimento da doença pela classe médica em população de pacientes não triados, além da alta taxa de heterozigotos. Em relação aos trabalhos que incluíram avaliação de custo, nota-se que os mesmos variaram consideravelmente entre os diferentes programas de triagem neonatal. Em geral, o custo unitário dos testes variou entre 0,15 e 0,40 Dólares nos EUA. O custo mais alto foi estimado para os laboratórios privados, em torno de 1,13 Dólar (WOLF; HEARD, 1990), porém o custo real é muito mais elevado dentro de toda logística necessária para a triagem neonatal.

Destaca-se, ainda, que as reais consequências de uma deficiência marginal de biotina em pacientes com deficiência de biotinidase, quando associada a outros fatores desencadeantes, não foram totalmente esclarecidas. Desta forma, vários autores defendem que mais pesquisas sobre a DB são necessárias, principalmente no que diz respeito à identificação e evolução dos casos sintomáticos, assintomáticos, bem como à correlação entre genótipo e fenótipo. Tais estudos fornecerão informações essenciais sobre o prognóstico e tratamento dessa doença, que poderão ser utilizados especificamente na avaliação de cada caso na prática clínica.

Portanto, este trabalho foi o primeiro passo para novas pesquisas em nosso meio, ressaltando-se a importância da continuidade dessa linha de pesquisa para o esclarecimento dos seguintes aspectos:

- Avaliar o genótipo dos casos de DB identificados pelo teste de triagem do presente estudo para verificar a mutação mais comum;
- correlacionar os níveis de atividade sérica da biotinidase com o genótipo;
- avaliar os distúrbios auditivos e visuais dos casos de DB tratados precocemente, diagnosticados neste projeto e confirmados pelo teste molecular;
- descontinuar o tratamento com biotina dos casos de DB, baseado nos dados do estudo molecular;
- identificar possíveis casos assintomáticos entre pais e irmãos dos casos índices deste projeto.

REFERÊNCIAS

- CAMARGO NETO, E. *et al.* Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 3, p.295-9, mar. 2004.
- DHONDT, J.L. Neonatal screening from the Guthrie age to the genetic age. **J Inherit Metab Dis**, v. 30, p. 418:422, 2007.
- FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. 4. edição, Porto Alegre: Artmed. reimpressão 2008, p. 56-97, 2006.
- FRANÇA, J.L. *et al.* **Manual para normalização de publicações técnico-científicas**. Belo Horizonte: UFMG, 8. edição, 2007.
- MUHL, A. *et al.* Molecular characterisation of 34 patients with biotinidase deficiency ascertained by newborn screening and family investigation. **Eur J Hum Genet**, v. 9, n. 4, p. 237-43, Apr. 2001.
- POLLIT, R.J. Introduction new screens: Why are we all doing different things? **J Inherit Metab Dis**, v. 30: p. 423-29, 2007.
- SOUZA, M.S.L. **Orientações para apresentação e redação de projetos de pesquisa e trabalhos científicos**. Belo Horizonte: Coopmed, 2008.
- WEBER, P.S.S.; BAUMGARTNER, E.R. Outcome in patients with profound biotinidase deficiency: relevance of newborn screening. **Dev Med Child Neurol**, v. 46, n. 7, p. 481-4, Jul. 2004.
- WOLF, B. Biotinidase deficiency: new directions and practical concerns. **Curr Treat Options Neurol**, v. 5, n. 4: p. 321-8, Jul. 2003.
- WOLF, B. Disorders of biotin metabolism. *In*: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic & molecular bases of inherited disease**. 8th edition. New York, Mc-Graw-Hill Co, p. 3935-62, 2001.
- WOLF, B. *et al.* Phenotypic variation in biotinidase deficiency. **J Pediatr**, v. 103, n. 2, p. 233-7, Aug. 1983.
- WOLF, B.E.; HEARD, G.S. Screening for biotinidase deficiency in newborns: worldwide experience. **Pediatrics**, v. 85, n. 4, p. 512-7, Apr. 1990.

APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice A – Metodologia

1 Métodos

1.1 Desenho do estudo

Realizou-se um estudo transversal a partir de teste de triagem para DB em recém-nascidos participantes do Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN-MG), no estado de Minas Gerais, no período de setembro de 2007 a junho de 2008. Posteriormente, realizou-se um estudo prospectivo dos casos identificados na pesquisa, durante período máximo de 16 meses, com o objetivo de avaliar a evolução clínica após instituição do tratamento.

1.2 População estudada

Foram incluídos no estudo todos os recém-nascidos (RNs) participantes do PETN-MG no período de setembro de 2007 a junho de 2008. O sangue em papel-filtro (PF) é rotineiramente colhido no quinto dia de vida.

O tamanho da amostra foi baseado na literatura, tendo em vista que a incidência mundial mostrou as seguintes taxas: incidência combinada de DB 1: 60.089 NVs (1:49.500 a 1:73.100), DTB 1:112.271 NVs (1:85.000 a 1:145.000); DPB 1:129.282 NVs (1:112.700 a 1:177.000), com intervalo de confiança (IC) de 95%. A partir desses dados, inferiu-se que uma amostra de no mínimo 180.000 RNs seria suficiente para estimar a prevalência, levando-se em consideração que 1:177.000 foi o limite superior do intervalo de confiança da incidência estimada de DPB, que é superior ao da DTB. Como nasce uma média de 20.000 crianças por mês em Minas Gerais e no momento do estudo o PETN-MG abrangia aproximadamente 94,8% de todas as crianças vivas nascidas no estado, levando-se em

conta que poderiam ocorrer perdas, planejou-se que a coleta de sangue em PF deveria durar aproximadamente nove meses.

O estudo foi realizado em 182.942 RNs submetidos à coleta de sangue para o teste de triagem em Minas Gerais. Foi utilizada parte do material (sangue) dos RNs coletada em PF (*Schleicher & Shuell 903*) e enviada rotineiramente ao Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (NUPAD/FM/UFMG) para realização dos demais testes de triagem neonatal. Os pacientes diagnosticados com DB foram acompanhados pelo período máximo de um ano e quatro meses e continuarão sendo avaliados, indefinidamente, no Ambulatório de Doenças Neurogenéticas do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG, sob a responsabilidade da Professora Juliana Gurgel Giannetti.

1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo todos os pacientes cujos pais se recusaram a participar do mesmo.

1.4 Aspectos éticos

Este estudo visou a estimar a prevalência de DB na população de RNs no estado de Minas Gerais, no período de setembro de 2007 a junho de 2008.

Os objetivos do projeto foram esclarecidos à população envolvida, por meio de cartazes afixados em todos os centros de saúde conveniados e informes técnicos distribuídos para os profissionais responsáveis pela coleta. Além disso, foi realizada uma teleconferência em agosto de 2007, que foi transmitida às unidades de saúde da capital e interior de Minas Gerais para esclarecer sobre os procedimentos e as doenças que seriam incluídas no **teste do pezinho** como projetos-pilotos, incluindo a DB. Desta forma, todos os RNs que procuraram o posto de saúde para realizar a triagem neonatal foram elegíveis para participar do estudo. O profissional do posto de saúde responsável pela coleta de sangue fez os esclarecimentos e apresentou a carta-convite e o termo de consentimento simplificado aos responsáveis pela criança, para participarem do estudo.

Dúvidas poderiam ser esclarecidas na hora por esse profissional treinado previamente. E quando o responsável pela criança concordou em participar, foi solicitada sua assinatura no envelope contendo o papel-filtro (PF). Quando os resultados do teste

qualitativo (após a segunda amostra do PF) foram positivos, os pais foram convidados juntamente com a criança a comparecerem à primeira consulta no Ambulatório São Vicente do HC-UFG, momento em que se prestaram, novamente, esclarecimentos aos responsáveis pela criança. E, desde que estivessem de acordo com o estudo, a pesquisadora responsável solicitava-lhes a assinatura no Termo de Consentimento Esclarecido. (APÊNDICE B).

O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (Parecer ETIC 430/07), aprovado em 23/10/2007 (ANEXO B).

1.5 Testes laboratoriais utilizados no diagnóstico

1.5.1 Teste de triagem para deficiência de biotinidase

1.5.1.1 Teste qualitativo colorimétrico

Foi utilizado o teste UMTEST BIOTINIDASA, desenvolvido em Cuba, para detectar a atividade da enzima biotinidase em amostras de sangue de RNs coletadas em PF (*Schleicher & Shuell* 903), realizado no laboratório do NUPAD/FM/UFG. A bula fornecida pelo fabricante do teste informava sensibilidade e especificidade de 100%. Os procedimentos para a realização do teste foram os recomendados pelo fabricante.

1.5.1.2 Coleta da amostra

A amostra de sangue foi obtida na punção do calcanhar do RN e coletada em PF, entre o quinto e o sétimo dias de vida, de acordo com o procedimento padronizado pelo PETN-MG.

Nos casos em que o teste foi positivo ou indeterminado na primeira amostra realizada em duplicata, foi solicitada e orientada a coleta de uma segunda amostra no próprio município, para confirmação do resultado do teste de triagem.

As tiras de papel-filtro foram identificadas no momento da coleta, com os dados seguintes: código da unidade de saúde, iniciais e registro da mãe e data da coleta. Cada amostra cadastrada no sistema recebeu, como de rotina, um código composto de três letras.

1.5.1.3 Princípio do método

Trata-se de um ultramicroensaio colorimétrico qualitativo. Foi medida a atividade hidrolítica da enzima biotinidase, mediante a hidrólise do substrato biotin-ácido p-aminobenzoico (B-PABA). Em condições ótimas de pH e temperatura, obteve-se como produto o ácido p-aminobenzoico (PABA). Este último, em meio ácido e em nitrito de sódio e sulfamato de amônio, formou um complexo de cor púrpura com a vitamina K-6. A intensidade da cor obtida foi proporcional à atividade da enzima biotinidase presente na amostra.

A - Componentes do kit

- placa de reação com 12X8 cavidades (F42)
- cartela com controles em sangue seco
- Controle de reativos (CR)
- Controle 1 (controle sem atividade da enzima)
- Controle 2 (controle com atividade da enzima)
- R1: tampão fosfato (pronto para uso)
- R2: substrato (pronto para uso)
- R3: Nitrito de sódio (pronto para uso)
- R4: Sulfamato de amônio (pronto para uso)
- R5: Vitamina K6 (reconstituída com 5 mL de água destilada)

Todos os reagentes foram mantidos em temperatura entre 2 e 8°C. A solução R5 após reconstituição ficou estável durante 15 dias.

B - Procedimento Técnico

B.1. Preparação do controle R

Cortou-se com um perfurador de papel um disco de 3 mm de diâmetro na mancha de sangue correspondente ao controle R. Colocou-se esse picote na cavidade indicada para o controle R na placa de microtitulação e acrescentaram-se 70 µL da solução R1. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

B.2. Preparação dos controles 1, 2 e das amostras

Cortou-se com um perfurador de papel um disco de 3 mm de diâmetro na mancha de sangue correspondente aos controles 1, 2 de cada amostra. Foram, então, colocados nas cavidades indicadas para os controles 1, 2 e amostras na placa de microtitulação e

acrescentaram-se 70 μL da solução R2. Esse procedimento foi feito em duplicata para cada controle e cada amostra.

Após preparação dos controles e amostras na placa, a mesma foi agitada por 5 minutos. A seguir, incubada por 16 a 20 horas a 37°C , em câmara úmida.

B.3. Transferência dos controles e amostras para a placa de reação (F42)

Transferiram-se 10 μL dos controles e das amostras para a placa de reação (F42), seguindo o mesmo esquema de distribuição do item B.2.

B.4. Adição de solução de ácido tricloroacético (TCA)

Adicionaram-se 10 μL da solução de TCA 30% previamente conservada entre 2 e 8°C , em cada cavidade da placa de reação. Deixou-se, então, a placa em repouso por 10 minutos.

B.5. Adição da solução de nitrito de sódio

Adicionaram-se 10 μL da solução de trabalho R3 em cada cavidade da placa de reação e aguardaram-se 3 minutos.

B.6. Adição da solução de sulfamato de amônio

Adicionaram-se 10 μL da solução de trabalho R4 em cada cavidade da placa de reação e aguardaram-se 3 min.

B.7. Adição da solução de vitamina K6

Adicionaram-se 10 μL da solução de trabalho R5 em cada cavidade da placa de reação. A placa de reação foi incubada à temperatura ambiente (20 a 25°C) em câmara úmida. Aguardaram-se 10 minutos para a interpretação dos resultados. O sinal de cor ficava estável até 1 hora depois de concluída a reação, se a placa fosse mantida úmida e sem exposição à luz.

C- Interpretação dos resultados

As condições mínimas requeridas para assegurar a qualidade do ensaio foram as seguintes (FIG. 1):

- Não deveria se formar complexo colorido nas posições do controle R;
- não deveria se formar complexo colorido nas posições do controle 1;
- na posição do controle 2 deveria formar-se um complexo de cor púrpura.

QUADRO 1 - Interpretação dos resultados do teste colorimétrico UMTEST BIOTINIDASA

Cor	Resultado	(Conduta)
Púrpura	Presença de atividade de biotinidase normal	(Alta do paciente)
Ausência de cor	Ausência de atividade de biotinidase: Possível deficiência enzimática total	(Repetir a amostra)
Púrpura claro	Atividade de biotinidase significativamente reduzida Possível deficiência enzimática parcial	(Repetir a amostra)
Púrpura intensa	Suspeita de substância cromogênica	(Repetir teste sem substrato)

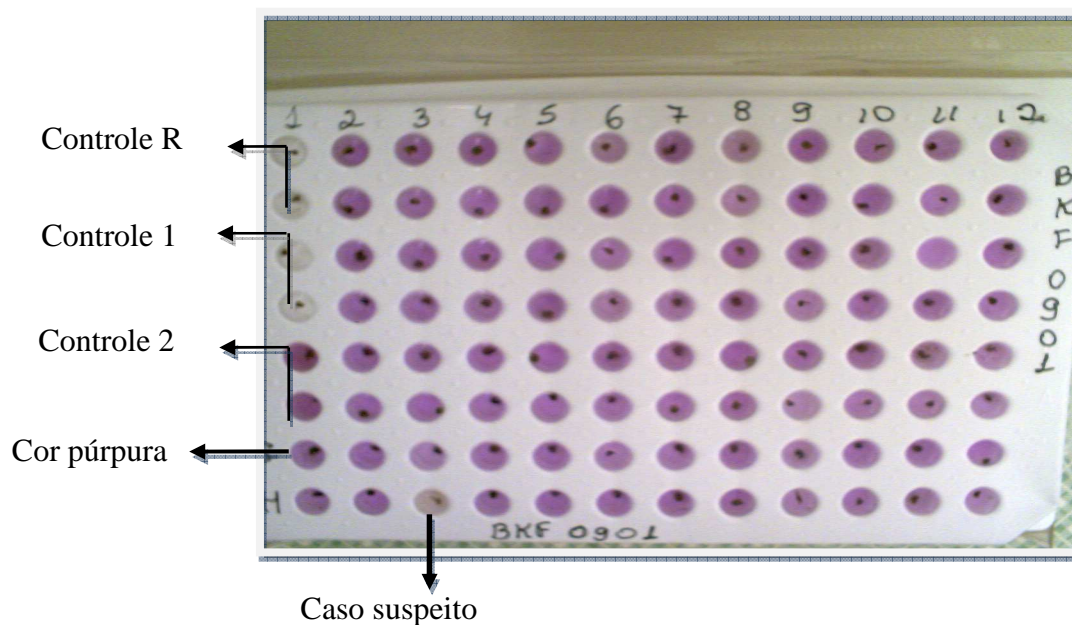


FIGURA 1 - Placa F 42 do teste qualitativo UMTEST BIOTINIDASA mostrando a disposição dos controles de DB, um caso suspeito de DB e amostras normais, durante o estudo de triagem neonatal, realizado pelo PETN-MG, no período de setembro de 2007 a junho de 2008.

1.5.1.4 Teste confirmatório quantitativo

O teste quantitativo foi realizado em pacientes que apresentaram resultado alterado na segunda amostra coletada para o teste qualitativo (teste de triagem), no laboratório do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Trata-se de um teste com leitura colorimétrica, realizada em espectrofotômetro, que mede a liberação de p-aminobenzoato de N-biotinil-p-aminobenzoato.

QUADRO 2 - Interpretação dos resultados dos níveis de biotinidase do teste confirmatório

Resultado	Interpretação
5,1 a 10 *	Normal
2,2 a 5,0 *	Heterozigotos
0,71 a 2,1 *	Deficiência parcial (10 a 30% de atividade média normal de biotinidase)
0 a 0,7 *	Deficiência total (menos de 10% de atividade média normal de biotinidase)

* nmo/mL/min, média da atividade de biotinidase = 7,1 nmol/mL/min, substrato artificial utilizado B-PABA.

1.5.2 Avaliação das amostras suspeitas

A primeira amostra para o teste qualitativo foi processada em duplicata. Quando ela resultou alterada ou indeterminada, foi realizada na própria Unidade de Saúde de Referência uma segunda coleta de sangue em PF, previamente orientada pelo NUPAD/FM/UFMG quanto aos cuidados com a coleta e o envio do material.

Quando o resultado do teste qualitativo na segunda amostra revelou-se alterado, o paciente foi convocado a comparecer ao Ambulatório São Vicente do Hospital das Clínicas da Universidade de Minas Gerais (HC-UFMG) e sua amostra de sangue foi coletada no laboratório do NUPAD/FM/UFMG, por punção venosa. Coletaram-se cerca de 1,0 mL de sangue total em tubo seco; em seguida, centrifugou-se e separou-se o sobrenadante (soro), que foi estocado em *freezer* -80°C e transportado em gelo seco a -70°C. Esse material foi enviado ao laboratório terceirizado pelo NUPAD-UFMG, juntamente com amostra de um controle não relacionado com o probando e supostamente normal, coletada e estocada sob as mesmas condições especificadas previamente. O envio conjunto do controle foi feito em

60% dos casos. O procedimento em relação às amostras suspeitas está detalhado nos próximos subitens.

1.6 Avaliação e acompanhamento dos pacientes

1.6.1 Avaliação e acompanhamento dos pacientes suspeitos

Os pais dos pacientes cujo teste qualitativo (segunda amostra) foi positivo para DB foram contatados pelo Setor de Controle de Tratamento do NUPAD e convidados a comparecer à consulta no Ambulatório São Vicente do HC-UFG, realizada por neuropediatra (pesquisadora). Realizaram-se os seguintes procedimentos:

- Anamnese clínica em que se solicitaram: o cartão de pré-natal da mãe, cartão de nascimento da criança com os dados de APGAR, perímetro cefálico, estatura, peso, idade gestacional, relato de icterícia, realização de fototerapia e uso de qualquer medicação pela criança durante o período da coleta de sangue para triagem neonatal. Quando o cartão do RN não continha essas informações a família era consultada a respeito. Complementou-se a anamnese geral com anamnese dirigida para possíveis sinais e sintomas de DB que já poderiam estar ocorrendo nesse período de vida, como: vômitos, irritabilidade, lesões de pele e queda de cabelo acima do normal para a idade (APÊNDICE C);
- exame clínico e neurológico do paciente;
- coleta do soro para confirmação do diagnóstico pelo teste quantitativo.

Nos casos em que o teste quantitativo foi negativo, os pais e a Unidade de Saúde de Referência receberam uma carta resposta explicativa contendo o resultado do referido teste e a conclusão final da análise realizada. Esse paciente foi liberado do estudo e do acompanhamento. Nos casos com DB confirmada pelo teste quantitativo, os pais foram reconvocados para uma segunda consulta no Ambulatório São Vicente do HC-UFG.

1.6.2 Avaliação e acompanhamento dos pacientes afetados

Os casos com DB confirmada pelo teste quantitativo foram, juntamente com os pais, reconvocados para uma segunda consulta no Ambulatório São Vicente do HC-UFG. Além do exame clínico e neurológico da criança, os pais receberam informações sobre o resultado do exame realizado, orientações sobre a doença e tratamento. Após o

término da consulta, as crianças foram encaminhadas para realização de eletroencefalograma no terceiro andar, ala oeste, no setor de Neurofisiologia do HC-UFMG, que consistiu na aquisição de traçado eletroencefalográfico durante os estados de vigília e sono espontâneo, pelo período mínimo de 40 minutos. Foi utilizado eletroencefalógrafo da marca NIHON-KODEN, modelo analógico, com 10 canais, de acordo com as normas técnicas próprias para recém-nascido e lactente. Não se utilizou, em qualquer hipótese, medicação indutora de sono. As crianças foram acompanhadas e reavaliadas por neuropediatra (pesquisadora) trimestralmente para acompanhamento do desenvolvimento neurológico da criança (FIG. 1, APÊNDICE D).

1.7 Tratamento das crianças afetadas

Iniciou-se, para todos os casos com DB, tratamento com biotina na dose de 10 mg/dia, apresentação em cápsulas, manipulada de acordo com a prescrição da pesquisadora, fornecida gratuitamente pelo NUPAD/FM/UFMG. Orientaram-se as famílias que abrissem a cápsula e diluíssem o conteúdo em pequeno volume de água em uma colher de chá e administrassem à criança diariamente. O gasto foi estimado em 14 reais mensalmente.

O tratamento deverá ser mantido e, ao final deste estudo, o acompanhamento dos casos será mantido no Ambulatório de Neurogenética do HC-UFMG, aos cuidados da Prof^a. Dr^a.Juliana Gurgel Giannetti.

1.8 Análise estatística

Realizou-se análise por meio de cálculos de prevalência com a finalidade de estimar a prevalência da DB na população de RN no estado de Minas Gerais. Comparou-se o teste qualitativo com o quantitativo, tendo-se o último como padrão-ouro. Foram calculados sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste UMTEST BIOTINIDASA após conhecerem-se os valores de falso-positivos e falso-negativos (FLETCHER; FLETCHER, 2006).

Referentes à triagem neonatal, quanto à amostra total, as variáveis estudadas foram:

- A cobertura do programa: razão entre o número de RNs que realizaram a triagem neonatal pelo número de nascidos vivos, no período estudado, multiplicada por 100;

- intervalo, em dias, decorridos entre a data de nascimento da criança e a realização da coleta da primeira amostra de PF;
- número de amostras do PF inadequadas bem como a frequência dos motivos da inadequação das mesmas;
- taxa de reconvocação considerado o número de RNs referidos para a segunda amostra de PF.

Em relação aos 10 casos de DPB, as variáveis estudadas foram:

- Intervalo entre o envio da amostra de PF e a chegada da mesma ao NUPAD/FM/UFGM;
- intervalo entre a chegada e a emissão dos resultados,
- idade do RN no momento resultado liberado pelo laboratório;
- a idade da confirmação diagnóstica, isto é, o resultado do teste quantitativo de biotinidase;
- a dosagem de biotinidase dos casos e dos controles;
- a idade da primeira consulta;
- a idade de início do tratamento;
- o tempo de acompanhamento;
- o número de consultas.

Os dados das fichas originais dos casos com DB foram transferidos para o banco de dados pela pesquisadora responsável, preparados em planilhas e submetidos à análise descritiva com cálculo dos seguintes valores: média, mediana, máximo e mínimo e desvio-padrão para as variáveis numéricas contínuas e frequências absolutas e relativas para as variáveis categóricas. Os pacotes estatísticos utilizados para a análise dos dados foram: *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 15®; *software R*, versão 2.9.2, para a confecção dos gráficos, que é gratuito e está disponível no *site*: <http://www.r-project.org/>

1.9 Apoio financeiro

Este projeto foi desenvolvido com verba e apoio logístico do NUPAD-UFGM.

Apêndice B - Termo de consentimento livre e esclarecido

Projeto de Pesquisa: Triagem Neonatal para Deficiência de Biotinidase no Estado de Minas Gerais

Investigador responsável: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Gurgel Giannetti

Objetivo da pesquisa:

Eu entendo que fui convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa para identificar indivíduos com deficiência de biotinidase, pelo teste do pezinho.

A deficiência de biotinidase é uma doença do metabolismo, de origem genética. A biotinidase é uma enzima importante no metabolismo da vitamina BIOTINA. Ela permite que a BIOTINA seja utilizada e reaproveitada pelo nosso organismo, diminuindo a necessidade de ingerirmos grandes quantidades desta vitamina pela dieta. Quando uma criança apresenta deficiência de biotinidase, a biotina não pode ser utilizada adequadamente e, como consequência, uma série de reações metabólicas estarão prejudicadas no organismo, levando ao aparecimento de vários problemas de saúde, tais como convulsão, atraso no desenvolvimento, surdez, queda de cabelo e alterações na pele.

O objetivo geral da pesquisa é estimar a prevalência da doença no estado de Minas Gerais e identificar o mais cedo possível os pacientes com a doença, para que possa ser iniciado o tratamento antes do surgimento de sintomas e complicações da doença.

O estudo será mantido em segredo, com a utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

Procedimento:

Eu entendo que, se concordar em participar deste estudo, estarei autorizando que o sangue do meu filho colhido para o teste do pezinho também seja utilizado nesta pesquisa, para realização do teste de triagem para deficiência de biotinidase.

Se o meu filho tiver a doença, será avaliado e acompanhado pela equipe envolvida neste projeto. O tratamento será feito com o uso de biotina oral.

Risco e desconforto:

Eu entendo que, ao aceitar participar desta pesquisa, meu filho não será submetido a nenhum risco ou desconforto. Caso o meu filho tenha deficiência de biotinidase, será submetido à avaliação clínica e exames complementares realizados de rotina no acompanhamento aos pacientes afetados pela deficiência de biotinidase.

Vantagens:

Eu entendo que a participação neste estudo permitirá o diagnóstico precoce da deficiência de biotinidase em meu filho, tornando possível o início do tratamento desta antes que surjam os sintomas da doença.

Sigilo:

Eu entendo que toda informação médica fará parte do prontuário médico do meu filho(a).

Se os resultados, informações ou imagens obtidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado e nas fotos serão utilizadas tarjas pretas sobre os olhos.

Recusa ou descontinuação da participação:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso recusar a participar do estudo a qualquer momento sem comprometer a realização do teste do pezinho para as outras doenças que normalmente são triadas.

Reconheço também que a Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti pode interromper a minha participação neste estudo a qualquer momento que julgar apropriado.

Eu confirmo que a Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti explicou-me o objetivo do estudo e as possíveis vantagens advindas deste projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi, este formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar da pesquisa.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

Data:

Responsabilidade do Pesquisador:

Eu, _____, expliquei a

o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e as possíveis vantagens que poderão advir do mesmo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia deste formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador ou associado:

Assinatura do pesquisador ou associado:

Comitê de Ética em Pesquisa- UFMG
Prof^a. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Unidade Administrativa II-2º andar - sala 2005
Av. Antônio Carlos, 6627- Pampulha
Fone: 3499-4592

Pesquisadores Responsáveis:
Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti
Dr^a. Marilis Tissot Lara
Departamento de Pediatria – FM/UFMG
Av. Alfredo Balena, 190 – 4º andar sala
Fone: 3248-9773

Apêndice C – Ficha para anamnese



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE AÇÕES E PESQUISA EM APOIO DIAGNÓSTICO - NUPAD



1ª consulta - Hospital das Clínicas – UFMG Data: ____ / ____ / ____ Idade: ____
 Nome: _____
 Data de nascimento: ____ / ____ / ____ Reg. HC: _____ Cód. Nupad: _____
 Naturalidade: _____ - _____
 Filiação: Mãe _____ Pai: _____
 Endereço: Rua/Av.: _____ N°: ____ Complemento: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ - _____
 Telefone(s): (____) _____ CEP: _____

Pré-natal
 Mãe: G ____ P ____ A ____ Idade: _____ anos _____
 Uso de medicamentos? _____
 Intercorrências? _____

Tipo de parto: vaginal cesáreo APGAR: 1': _____ 5': _____
 Idade gestacional: _____; Peso: _____g; Estat: _____;cm PC: _____cm
 Classificação: _____ Intercorrências perinatais? _____

Histórico familiar
 Consanguinidade Sim Não
 Irmãos: N°: _____ Algum afetado: Sim Não
 Observações:

Triagem Neonatal
 (teste qualitativo)
1ª Amostra: Data: ____ / ____ / ____ (_____ dias de vida)
2ª Amostra: Data: ____ / ____ / ____ (_____ dias de vida)

Triagem Neonatal
 (teste quantitativo)
1ª Amostra: Data: ____ / ____ / ____ (_____ dias de vida)
2ª Amostra: Data: ____ / ____ / ____ (_____ dias de vida)

Anamnese

Exame físico

Peso: _____ g (DP: _____) Comprimento: _____ cm (DP: _____);

PC: _____ cm (DP: _____)

Exame físico geral: Normal Alterado

Observações: _____

Exame Neurológico: Exame físico geral: Normal Alterado

Observações: _____

Hipóteses diagnósticas

Conduta

Retorno Data: ____/____/____ Próximos exames: ____/____/____

Exames solicitados

Dosagem quantitativa de biotinidase _____

EEG _____

Observações _____

Médico (carimbo/assinatura)

Setor de Controle do Tratamento do Nupad / FM / UFMG

Fone: (31) 3244-6400 / (31) 3244-6413 - Fax: (31) 3244-6403 / (31) 3244-6451

E-mail: controle@nupad.medicina.ufmg.br - Site: www.nupad.medicina.ufmg.br

Apêndice D - Fluxograma

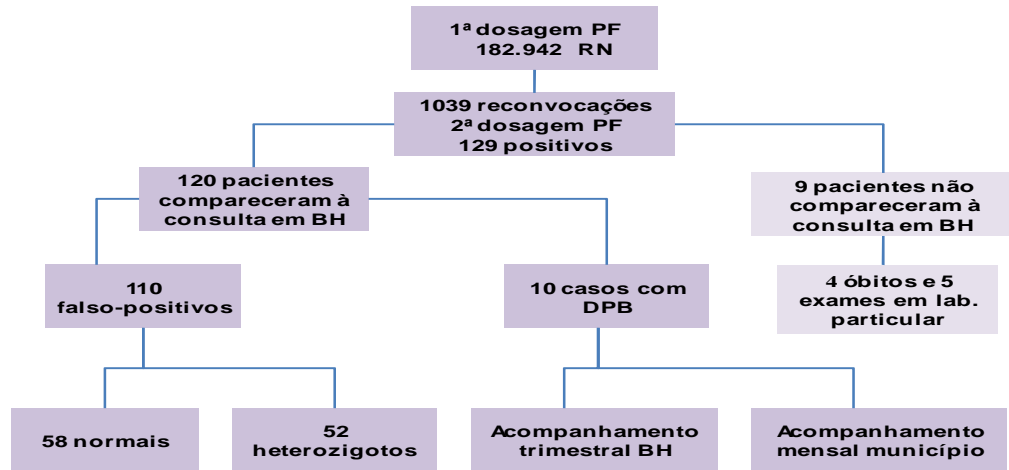


FIGURA 1 - Fluxograma mostrando 182.942 RN triados para DM pelo PETN–MG, no período de setembro de 2007 a junho 2008, 1039 reconvocações para 2º cartão de PF, 120 resultados suspeitos e submetidos ao teste confirmatório para DM, 60% com controle concomitante; 10 casos de DPB, 110 falso-positivos.


Anexo A – Critérios da OMS para inclusão de uma doença na triagem neonatal

Figura 1 - Critérios para que uma doença seja candidata a ser incluída na triagem neonatal

- 1) A doença deve ser relativamente prevalente e grave
- 2) Os sintomas devem ser conhecidos e inaparentes no período neonatal
- 3) Fácil de ser diagnosticada
- 4) Permitir a realização de um teste viável e com alta sensibilidade e especificidade
- 5) O método diagnóstico deve estar disponível para acompanhamento e tratamento das crianças afetadas
- 6) Ter um programa logístico para acompanhamento dos casos até diagnóstico final
- 7) Ser um programa economicamente viável
- 8) Ter estabelecido um programa de acompanhamento clínico com disponibilização dos quesitos mínimos necessários ao sucesso do tratamento

Fonte Manual de normas técnicas e rotinas operacionais para programa nacional de triagem neonatal (2004).

Anexo B – Parecer ético

	Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP
---	--

Parecer nº. ETIC 430/07

Interessado(a): Profa. Juliana Gurgel Giannetti
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 23 de outubro de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Triagem neonatal para deficiência de Biotinidase no Estado de Minas Gerais**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG