

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e Adolescente

Nara de Oliveira Carvalho

**Caracterização bioquímica e genética
da deficiência de biotinidase no Programa de Triagem Neonatal
de Minas Gerais: estudo prospectivo de cinco anos**

Belo Horizonte

2019

Nara de Oliveira Carvalho

**Caracterização bioquímica e genética
da deficiência de biotinidase no Programa de Triagem Neonatal
de Minas Gerais: estudo prospectivo de cinco anos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Marcos Borato Viana

Co-Orientadora: Dra. Rocksane de Carvalho Norton

Área de concentração: Distúrbios do Período Perinatal e Neonatal:
Aspectos Clínicos e Genéticos

Belo Horizonte

2019

Carvalho, Nara de Oliveira.
C331c Caracterização bioquímica e genética da deficiência de biotinidase no Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais [recursos eletrônicos]: estudo prospectivo de cinco anos. / Nara de Oliveira Carvalho. -- Belo Horizonte: 2022.
98f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Marcos Borato Viana.
Coorientador (a): Rocksane de Carvalho Norton.
Área de concentração: Distúrbios do Período Perinatal e Neonatal.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Deficiência de Biotinidase. 2. Triagem Neonatal. 3. Genótipo. 4. Dissertação Acadêmica. I. Viana, Marcos Borato. II. Norton, Rocksane de Carvalho. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WS 141

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-8/2697

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-reitor de Pós graduação

Fábio Alves daSilva Junior

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-graduação

Tarcizo Afonso Nunes

Chefe do Departamento de Pediatria

Mônica Maria de Almeida Vasconcelos

Colegiado do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e Adolescente

Coordenador

Roberta Maia de Castro Romanelli

Sub-Coordenador

Débora Marques de Miranda

Ana Cristina Simões e Silva

Jorge Andrade Pinto

Helena Maria Gonçalves Becker

Roberta Maia de Castro Romanelli

Juliana Gurgel

Débora Marques de Miranda

Sérgio Veloso Brant Pinheiro

Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE



FOLHA DE APROVAÇÃO

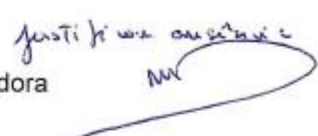
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DAS FORMAS PROFUNDAS E PARCIAIS DA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE NO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS: ESTUDO PROSPECTIVO DE CINCO ANOS

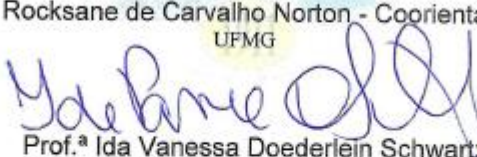
NARA DE OLIVEIRA CARVALHO

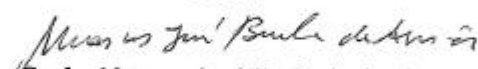
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Ciências da Saúde.

Aprovada em 27 de novembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Marcos Borato Viana - Orientador
UFMG


Prof.ª Rocksane de Carvalho Norton - Coorientadora
UFMG


Prof.ª Ida Vanessa Doederlein Schwartz
UFRGS


Prof. Marcos José Burle de Aguiar
UFMG


Prof.ª Ana Cristina Simões e Silva
UFMG


Prof.ª Ana Maria Martins
UNIFESP

Belo Horizonte, 27 de novembro de 2019.

Ao meu filho Thales, minha maior riqueza
e razão das minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio às minhas decisões e pelo incentivo constante nesta e em outras empreitadas, pelo exemplo de força e persistência na luta por seus ideais. Sou e sempre serei muito grata por tudo que têm me ensinado e por todos os princípios que me transmitiram.

Ao meu marido, companheiro para todos os momentos, passamos juntos por mais este desafio, obrigada pelo apoio e incentivo constante.

Ao meu filho, ainda pequeno para entender o motivo dos momentos de tensão e falta de tempo, tudo que faço hoje é pensando em garantir um futuro melhor para você.

Aos meus orientadores Marcos Borato Viana e Rocksane de Carvalho Norton, pela confiança e comprometimento na realização deste trabalho, exemplos de compromisso com a pesquisa e rigor científico na busca incessante do conhecimento. O árduo e laborioso trabalho despendido na reta final deste trabalho são motivos de uma saudação especial.

Ao Prof. José Nelio Januário, diretor geral do Nupad, pelo incentivo à pesquisa, apoio e colaboração, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

A Dra. Dora, quem iniciou as atividades do laboratório de genética do Nupad e que por mais de 20 anos se dedicou ao desenvolvimento do Núcleo, exemplo de competência e profissionalismo, agradeço a confiança e apoio para que eu pudesse me dedicar às atividades deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de genética, do laboratório de triagem neonatal, ao pessoal do ambulatório, em especial a Dra. Ana Lúcia Pimenta Starling e Dr. Rodrigo Rezende Arantes, toda equipe do Nupad que, direta ou indiretamente, colaboraram para que esse trabalho fosse realizado com sucesso, agradeço pelo apoio, incentivo, colaboração e amizade.

Saudações especiais aos pais, responsáveis e crianças envolvidos neste estudo. A participação de vocês é essencial para o desenvolvimento de pesquisas científicas. Agradeço a confiança e por terem entendido a relevância desta pesquisa.

RESUMO

A deficiência da biotinidase (DB) é doença metabólica hereditária, autossômica recessiva, causada por mutações no gene da biotinidase (*BTD*), localizado no cromossomo 3. Apresenta expressão fenotípica diversa em razão de deficiência variável da atividade da enzima biotinidase. Se não diagnosticada precocemente, pode causar retardo mental e até morte. O tratamento preventivo é simples e de baixo custo, consistindo na ingestão de doses farmacológicas de biotina livre durante toda a vida. Este é um estudo populacional para confirmar a incidência da DB profunda e parcial em recém-nascidos (RN) triados pelo PTN-MG, estabelecer a frequência das variantes identificadas no *BTD*, estimar a frequência da variante p.D444H na população triada e correlacionar os níveis de atividade enzimática da biotinidase com o genótipo. Todos os testes bioquímicos e moleculares foram realizados nos laboratórios do Nupad-UFMG. Durante os 5 anos de estudo foram triados 1.168.385 RN e 634 apresentaram resultados alterados para triagem em papel filtro. Em 620 RN foi determinada a atividade sérica da biotinidase, sendo confirmados 84 RN com DB (6 com DB profunda e 78 com DB parcial) e 52 RN considerados suspeitos de terem a doença. A incidência combinada da DB foi de 1:13.909 (IC95% - 1:11.235 a 1:17.217). O sequenciamento de *BTD* nos 136 RN identificou 36 mutações, sendo 9 ainda sem registro em banco de dados. As variantes mais frequentes foram a p.D444H, p.[A171T;D444H], p.D543E, intrônica (c.310-15delT), p.V199M e p.H485Q. A frequência do alelo p.D444H foi estimada em 0,016 e a de indivíduos heterozigotos, 0,031. Observou-se que nem sempre a correlação fenótipo bioquímico e genótipo é consistente dada a variabilidade da atividade enzimática tanto entre pacientes com o mesmo genótipo quanto no mesmo paciente em dosagens consecutivas. Na grande maioria dos pacientes com DB parcial identificou-se a dupla heterozigose de p.D444H com outra variante, sendo observada um contínuo de valores entre 15% e 33% da atividade enzimática de referência. Quando a outra variante era sabidamente patogênica “grave”, a variação sempre ocorria dentro da faixa para DB parcial. Quando da segunda variante decorria defeito enzimático mais brando, os valores se aproximavam ou pouco ultrapassavam o ponto de corte superior para DB parcial. Conclui-se que a incidência combinada de DB em MG está entre as mais altas do mundo e que, portanto, a triagem neonatal cumpre papel crucial na identificação precoce da doença, propiciando tratamento preventivo dos sintomas e sequelas. A grande variabilidade genotípica observada nos pacientes reflete a origem multiétnica do estado. A determinação sérica da atividade enzimática é, sem dúvida, o teste mais importante para confirmação do diagnóstico da DB. O sequenciamento do gene *BTD*, principalmente nos casos com classificação bioquímica duvidosa, cumpre papel relevante na definição do status do paciente e da necessidade de suplementação de biotina. Este estudo demonstra que o programa de triagem neonatal para DB em Minas Gerais é viável, útil e provavelmente efetivo sob o ponto de vista econômico.

Palavras chaves: Deficiência de biotinidase, triagem neonatal, gene *BTD*, genótipo

ABSTRACT

Biotinidase deficiency (BD) is an autosomal recessive metabolic disorder caused by mutations in the *BTD* gene, located on chromosome 3. Diverse phenotypic expression is due to variable deficiency of biotinidase enzyme activity. If not diagnosed early in life, BD may cause mental retardation and even death. Preventive treatment is simple and inexpensive, consisting of administration of free biotin at pharmacological doses throughout life. This is a population-based study aiming to confirm the incidence of profound and partial BD in newborns (NB) screened by the PTN-MG, to establish the frequency of mutations identified in *BTD* gene, to estimate the frequency of p.D444H variant in the screened population, and to correlate levels of biotinidase enzymatic activity with the genotype. All biochemical and molecular tests were performed at Nupad-UFMG laboratories. During the five-year study, 1,168,385 newborns were screened and 634 had abnormal results in the filter-paper screening. Serum biotinidase activity was determined in 620 newborns, and BD was confirmed in 84 NB (6 with profound and 78 with partial BD); 52 NB were suspected of having the disease (upper borderline range). The combined incidence of BD was 1:13,909 (95%CI; 1:11,235 to 1:17,217). *BTD* sequencing in the 136 NB identified 36 mutations, 9 of which had not yet been registered in a public database. The most frequent variants were p.D444H, p.[A171T;D444H], p.D543E, intronic (c.310-15delT), p.V199M and p.H485Q. The frequency of the p.D444H allele was estimated at 0.016 and for heterozygous individuals, 0.031. Biochemical phenotype and genotype correlation has not been always consistent given some variability of enzymatic activity both between patients with the same genotype and in the same patient in consecutive dosages. In the great majority of patients with partial BD, the double heterozygosis of p.D444H was identified with another variant, being observed a continuum of values between 15% and 33% of the reference enzymatic activity. When the other variant was known to be “severely” pathogenic, the variation always occurred within the range for partial BD. When the second variant was due to a milder enzyme defect, the values approached or slightly exceeded the upper cutoff point for partial BD. In conclusion, the combined incidence of BD in MG is among the highest in the world and, therefore, neonatal screening plays a crucial role in the early identification of the disease, providing preventive treatment of symptoms and avoiding sequelae. The large genotypic variability observed in patients reflects the multiethnic origin of the state of MG. The serum determination of enzymatic activity is undoubtedly the most important test to confirm the diagnosis of BD. The *BTD* gene sequencing, especially in cases with doubtful biochemical classification, plays a relevant role in defining patient status and the need for biotin supplementation. This study demonstrates that DB screening program is feasible, useful, and probably cost-effective in Minas Gerais.

Key words: Biotinidase deficiency, newborn screening, *BTD* gene, genotype

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – Representação esquemática do ciclo da biotina e da regulação da expressão gênica dependente de biotina..... | 23 |
| FIGURA 2 – Organização genômica do gene <i>BTD</i> , estrutura do RNAm e o peptídeo enzimático resultante com as regiões funcionais..... | 26 |
| FIGURA 3 – Tipos de variantes encontradas no gene <i>BTD</i> | 27 |
| FIGURA 4 – Base molecular da Deficiência de Biotinidase..... | 30 |
| FIGURA 5 – Esquema do protocolo de estudo..... | 44 |
| FIGURA 6 – Página de resumo do protocolo..... | 46 |
| FIGURA 7 – Teste quantitativo da atividade enzimática no soro..... | 47 |
| FIGURA 8 – Fluxograma da casuística..... | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Exemplo dos cálculos da atividade de Biotinidase no Excel..... | 48 |
| TABELA 2 – Referência para interpretação dos resultados da dosagem quantitativa da atividade da biotinidase - método colorimétrico (nmols/minuto/mL)..... | 48 |
| TABELA 3 – Conjunto de iniciadores utilizados para sequenciamento do gene <i>BTD</i> | 49 |
| TABELA 4 – Iniciadores utilizados para detecção da p.D444H..... | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – absorvância

ACC – Acetil-CoA-carboxilase

ASGR - receptor de asialoglicoproteínas

B-AMP – Biotinil-adenilato

ATP – adenosina trifosfato

BPABA – N-biotil p-aminobenzoato

BTD – biotinidase

cDNA – DNA complementar

cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

COLQ – *Acetylcholinesterase* associado ao colágeno

DB – deficiência de biotinidase

DMC – deficiência múltipla de carboxilases

DNA – ácido desoxirribonucleico

dL – decilitro

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA – Estados Unidos da América

FM – Faculdade de Medicina

FW – Forward

HACL1 – *Hydroxyacyl-CoA Lyase 1*

HCS – Holocarboxilase sintetase

H₂O – água

Kb – kilobase

LGBM – Laboratório de Genética e Biologia Molecular

LTN – Laboratório de Triagem Neonatal

MCC – Metilcrotonil-CoA-carboxilase

Mg – miligramas

min – minuto

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mL – mililitro

mM – milimolar

μL - microlitro

μM – micromolar

mm – milímetros

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

nm - nanômetro

nmol – nanomol

Nupad – Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico

OMIN – *Online Mendelian Inheritance in Man*

PABA - ácido p-aminobenzóico

pb – par de base

PC – Piruvato carboxilase

PCC – Propionil-CoA-carboxilase

PCR – *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

pmol – picomol

PKG - proteína quinase dependente de cGMP

PNTN – Programa Nacional de Triagem Neonatal

PTN-MG – Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais

RNA – ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

RV - reverso

rpm – rotações por minuto

seg – segundos

sGC – enzima guanilato ciclase

SISNEO – Sistema de Nacional de Triagem Neonatal

SMVT - transportador multivitamínico transmembrana dependente de sódio

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

u – unidade

UTR – *untranslated region* – regiões não codificantes

UV - ultravioleta

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 Referências bibliográficas..... | 18 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 19 |
| 2.1 Triagem Neonatal..... | 19 |
| <i>2.1.2 Triagem neonatal para deficiência de biotinidase.....</i> | <i>20</i> |
| <i>2.1.3 Fatores responsáveis por falsos positivos e falsos negativos.....</i> | <i>20</i> |
| 2.2 Deficiência de biotinidase..... | 21 |
| <i>2.2.1 Definição.....</i> | <i>21</i> |
| <i>2.2.2 Aspectos metabólicos.....</i> | <i>22</i> |
| <i>2.2.2.1 Biotina.....</i> | <i>22</i> |
| <i>2.2.2.2 Biotinidase.....</i> | <i>24</i> |
| <i>2.2.3 Aspectos genéticos.....</i> | <i>24</i> |
| <i>2.2.3.1 Gene BTB.....</i> | <i>24</i> |
| <i>2.2.3.2 Variantes que causam deficiência de biotinidase.....</i> | <i>26</i> |
| <i>2.2.4 Correlação do fenótipo bioquímico com o genótipo.....</i> | <i>29</i> |
| <i>2.2.5 Epidemiologia.....</i> | <i>31</i> |
| <i>2.2.6 Manifestações clínicas.....</i> | <i>32</i> |
| <i>2.2.6.1 Deficiência de biotinidase profunda.....</i> | <i>32</i> |
| <i>2.2.6.2 Deficiência de biotinidase parcial.....</i> | <i>32</i> |
| <i>2.2.6.3 Casos assintomáticos.....</i> | <i>33</i> |
| <i>2.2.7 Métodos diagnósticos.....</i> | <i>33</i> |
| <i>2.2.8 Tratamento.....</i> | <i>35</i> |
| 2.3 Referências Bibliográficas..... | 37 |
| 3 OBJETIVOS..... | 42 |
| 3.1 Geral..... | 42 |
| 3.2 Específicos..... | 42 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 43 |
| 4.1 Casuística..... | 43 |
| 4.2 Amostras de sangue..... | 43 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.3 | Considerações éticas..... | 45 |
| 4.4 | Metodologia..... | 45 |
| 4.4.1 | <i>Teste de triagem neonatal para deficiência de biotinidase.....</i> | 45 |
| 4.4.1.1 | <i>Teste semi-quantitativo da atividade da biotinidase em amostras de sangue seco em papel filtro.....</i> | 45 |
| 4.4.1.2 | <i>Teste quantitativo em soro.....</i> | 46 |
| 4.4.2 | <i>Testes moleculares para deficiência de biotinidase.....</i> | 49 |
| 4.4.2.1 | <i>Sequenciamento nucleotídico para o gene BTB.....</i> | 49 |
| 4.4.2.2 | <i>Detecção da variante D444H por PCR alelo-específica.....</i> | 52 |
| 4.5 | Análise dos dados..... | 53 |
| 4.6 | Referências bibliográficas..... | 54 |
| 5 | RESULTADOS..... | 55 |
| 5.1 | Fluxograma da casuística..... | 55 |
| 5.2 | Artigo 1: Frequency of biotinidase gene variants and incidence of biotinidase deficiency in the Newborn Screening Program in Minas Gerais, Brazil | 57 |
| 5.3 | Artigo 2: Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by the Newborn Screening Program in Minas Gerais, Brazil..... | 63 |
| 5.4 | Artigo 3: Genotype-biochemical phenotype correlation in biotinidase deficient children from the Newborn Screening Program in Minas Gerais, Brazil..... | 68 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 82 |
| 7 | PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 84 |
| 8 | CONCLUSÕES..... | 85 |
| 9 | ANEXOS..... | 86 |
| | ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 86 |
| | ANEXO B – Aprovação no Departamento de Pediatria da FM/UFMG..... | 88 |
| | ANEXO C – Aprovação no COEP da UFMG..... | 99 |
| | ANEXO D – Protocolos de extração de DNA..... | 90 |
| | ANEXO E: Tabela com dados dos 136 pacientes analisados no estudo..... | 91 |

1 Introdução

A deficiência de biotinidase (DB) foi descrita em 1983. Trata-se de doença metabólica hereditária, autossômica recessiva com fenótipo bastante variável (WOLF, 1983).

A biotinidase é enzima fundamental para o aproveitamento orgânico da biotina contida nos alimentos e para a reciclagem dessa vitamina no organismo. A deficiência da atividade enzimática causa depleção da biotina endógena devido à incapacidade orgânica em reciclar ou usar a biotina ligada às proteínas fornecidas pela dieta. Como consequência, origina-se quadro de deficiência múltipla de carboxilases (DMC), na forma tardia ou juvenil (HYMES; WOLF, 1996; WOLF, 1985).

A DB é classificada em parcial e profunda (grave), de acordo com a atividade enzimática no soro: DB profunda ou grave (até 10% da atividade média normal) e DB parcial (10% a 30% da atividade média normal). Sob o ponto de vista clínico, a forma clássica de DB manifesta-se mais comumente entre a sétima semana e o quinto mês de vida, podendo ocorrer mais precoce ou mais tardiamente e, até mesmo, não ocasionar sintomas. É distúrbio metabólico com variada expressão fenotípica, caracterizado principalmente por sintomas neurológicos e cutâneos, entre eles retardo mental, convulsões, ataxia, alopecia e dermatite (WOLF, 1991; ZEMPLINI; HASSAN; WIJERATNE, 2008).

Claramente, a DB preenche os critérios revisados de Wilson e Junger (POLLITT *et al.*, 1997) para inclusão na triagem neonatal: como já referido acima, a doença não é reconhecida clinicamente ao nascimento e os pacientes podem desenvolver sintomas que levam ao retardo mental e até a morte, se não diagnosticada precocemente. Trata-se, portanto, de doença com alta mortalidade e morbidade. O seu tratamento é simples e de baixo custo, consistindo na ingestão de doses farmacológicas de biotina livre durante toda a vida. Quando iniciado nos primeiros meses de vida, o tratamento evita o aparecimento dos sintomas (HEARD; McVOY; WOLF, 1984).

A DB foi primeiramente incluída no programa de triagem neonatal em 1984, no estado da Virginia (EUA), a partir do desenvolvimento de método colorimétrico simples, utilizado para determinação semiquantitativa da atividade enzimática da biotinidase em amostras de sangue seco em papel filtro (HEARD; McVOY; WOLF, 1984). Atualmente, todos os estados dos EUA e muitos outros países já incluíram a DB em seus programas de triagem neonatal (WOLF, 2017).

A prevalência da DB pode variar de acordo com a população estudada. A incidência mundial combinada de DB (deficiência profunda e parcial) foi estimada em 1:60.089 nascidos vivos (WOLF, 1991).

No Brasil, foram conduzidos poucos estudos referentes à deficiência de biotinidase, bem como ao estudo molecular do gene *BTD* (BORSATTO *et al.*, 2017; BORSATTO *et al.* 2014; LARA *et al.*, 2015; LUZ *et al.*, 2008; NETO *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 1998).

O Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG) iniciou suas atividades em 1993. Em 2013, foram incluídos os testes de triagem para DB e para hiperplasia adrenal congênita. Até então se desconhecia a incidência da DB no estado de Minas Gerais. A partir dos dados obtidos no estudo piloto realizado entre 2007 e 2008, foi possível estimar a incidência combinada de DB parcial e profunda em 1:22.861 nascidos vivos. Em 2014 foram implementados métodos moleculares para a detecção das mutações no gene *BTD*, por meio de sequenciamento nucleotídico, sendo possível analisar o DNA de oito recém-nascidos diagnosticados com deficiência enzimática da biotinidase. Os resultados finais deste estudo piloto sugeriam que a incidência combinada de DB era alta em relação às taxas encontradas em várias partes do mundo (LARA *et al.*, 2015).

Até o momento, já foram descritas mais de 200 mutações no gene *BTD* (http://www.arup.utah.edu/database/BTD/BTD_welcome.php), sendo que a prevalência dessas mutações no Brasil e em Minas Gerais ainda não está bem definida (BORSATTO *et al.*, 2014, 2017; LARA *et al.*, 2015; NETO *et al.*, 2004). Diante dessa realidade, tornou-se necessária a realização de estudo populacional para determinar a prevalência das mutações do gene *BTD*, bem como para confirmar a incidência da DB parcial e profunda na população triada pelo PTN-MG. Pretende-se, ainda, estabelecer a relação entre o fenótipo bioquímico e o genótipo e correlacionar resultados bioquímicos e moleculares para a confirmação dos valores do ponto de corte para o diagnóstico das diversas formas de DB no PTN-MG, propiciando indicação mais segura do tratamento para as crianças triadas.

A estrutura do presente estudo está em conformidade com as normas estabelecidas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Criança e do Adolescente para formato da tese, conforme Resolução 03/2010, de 05 de fevereiro de 2010.

1.1 Referências bibliográficas

1. Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Lima SE, Carvalho MRS, Fonseca PAS, Camelo JS, et al. Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177503.
2. Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Pinto LL, Luca GR, Carvalho FL, Souza CF, et al. Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 Brazilian patients. *BMC Med Genet*. 2014;15:96.
3. Heard GS, McVoy JRS, Wolf B. A screening method for biotinidase deficiency in newborns. *Clin Chem*. 1984; 30(1):125-7.
4. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta*. 1996; 255(1):1-11.
5. Lara MT, Gurgel-Giannetti J, Aguiar MJ, Ladeira RV, Carvalho NO, Del Castillo DM, et al. High Incidence of Biotinidase Deficiency from a Pilot Newborn Screening Study in Minas Gerais, Brazil. *JIMD Rep*. 2015; 24:103-7.
6. Luz GS, Carvalho MDB, Peloso SM, Higarashi IH. Prevalência das doenças diagnosticadas pelo programa de triagem neonatal em Maringá, Paraná, Brasil: 2001-2006. 2008; 29(3):446-53.
7. Neto EC, Schulte J, Rubim R, Lewis E, DeMari J, Castilhos C, et al. Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(3):295-9.
8. Pinto AL, Raymond KM, Bruck I, Antoniuk SA. Prevalence study of biotinidase deficiency in newborns. *Rev Saúde Pública*. 1998; 32(2):148-52.
9. Pollitt RJ, Green A, McCabe CJ, Booth A, Cooper NJ, Leonard JV, et al. Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome. *Health Technol Assess*. 1997; 1(7):1-202.
10. Wolf B. Successful outcomes of older adolescents and adults with profound biotinidase deficiency identified by newborn screening. *Genet Med*. 2017; 19(4):396-402.
11. Wolf B. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1991; 14(6):923-7.
12. 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.
13. Wolf B, Grier RE, McVoy JRS, Heard GS. Biotinidase deficiency: a novel vitamin recycling defect. *J Inherit Metab Dis*. 1985; 8 (Suppl 1):53-8.
14. Zempleni J, Hassan YI, Wijeratne SS. Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2008; 3(6):715-724.

2 Revisão da literatura

2.1 Triagem Neonatal

O desenvolvimento dos programas de triagem neonatal deriva dos esforços de Robert Guthrie, considerado o precursor da metodologia laboratorial para utilização em triagem neonatal, por ter desenvolvido uma técnica simples para diagnóstico da fenilcetonúria. O primeiro programa de triagem neonatal para diagnóstico da fenilcetonúria nos Estados Unidos da América (EUA) data de 1963. Desde então, ao longo dos anos, técnicas para o diagnóstico de várias doenças vêm sendo incorporadas aos programas de triagem neonatal, o que é considerado um sucesso em termos de saúde pública, pela possibilidade de diagnóstico e tratamento precoces de doenças graves, prevenindo o aparecimento dos sintomas e evitando possíveis sequelas. O método de triagem vem sendo implantado em vários países em todos os continentes, conforme as condições econômicas e políticas internas (DHONDT, 2007).

No Brasil, a triagem neonatal, conhecida como teste do pezinho, foi incorporada ao Sistema Único de Saúde (SUS) pela portaria GM/MS nº 22 de 15 de janeiro de 1992, com legislação que determina a obrigatoriedade de sua realização em todos os recém-nascidos vivos e incluía o teste para a fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito. Na segunda fase, iniciada em março de 1998, foi incluída a triagem para anemia falciforme e outras hemoglobinopatias. No ano de 2001, o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 822 de 06 de junho, que criou o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) e também os serviços de Referência em Triagem Neonatal em cada estado. Em 2003 foi implantada a terceira fase com a inclusão da Fibrose Cística. A quarta fase foi implantada em 2012 pela Portaria nº 2.829 de 14 de dezembro, incluindo a hiperplasia adrenal congênita e a deficiência de biotinidase (LARA *et al.*, 2014). Segundo dados do Ministério da Saúde o PNTN é um programa de ampla abrangência, tendo atingido mais de 84% de cobertura dos nascidos-vivos brasileiros na rede pública no ano de 2014 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Em Minas Gerais, o Programa de Triagem Neonatal (PTN-MG) foi instituído em 1993 e desde 2013 encontra-se na quarta fase, contemplando testes para as seis doenças acima citadas. O Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG (Nupad), a partir da sua criação, assumiu a coordenação técnica do PTN-MG sendo reconhecido e credenciado pelo Ministério da Saúde como único serviço de Referência em Triagem Neonatal para todo o estado. Atualmente o PTN-MG atinge cobertura próxima de 90% dos nascidos vivos, abarcando todos os 853 municípios do estado (JANUÁRIO, 2015). Os 10%

restantes fazem seus exames em laboratórios privados. De acordo com dados do Nupad (atualizados em 31 de dezembro de 2018), mais de 6 milhões de recém-nascidos foram triados pelo programa e 6.220 crianças/jovens estão em acompanhamento e tratamento para as doenças diagnosticadas (NUPAD, 2018).

2.1.2 Triagem neonatal para deficiência de biotinidase

A DB foi primeiramente incluída no programa de triagem neonatal em 1984, no estado da Virgínia (EUA), a partir do desenvolvimento de um método colorimétrico simples utilizado para a determinação semiquantitativa da atividade enzimática da biotinidase em amostras de sangue seco em papel filtro (HEARD; McVOY; WOLF, 1984).

Atualmente, todos os programas de triagem neonatal nos EUA e em mais de 30 países já realizam a triagem para DB (STROVEL *et al.*, 2017; WOLF; HEARD, 1990; WOLF, 1991).

Em Minas Gerais, foi realizado estudo piloto para triagem da DB em 2007, com duração de dez meses (cobertura de 94,8% dos nascidos-vivos), a partir do qual se obteve uma estimativa de incidência elevada de DB combinada (profunda e parcial) (LARA *et al.*, 2015). Oficialmente, a DB foi incluída no PTN-MG em maio de 2013.

Estudos têm mostrado o custo-benefício da triagem neonatal para a DB parcial e profunda (CARROLL; DOWNS, 2006; TORRES-VALLEJO *et al.*, 2015). A partir da experiência com a triagem neonatal, vários trabalhos vêm mostrando diferenças significativas no seguimento em longo prazo dos pacientes detectados no período neonatal (assintomáticos) em comparação com aqueles diagnosticados quando das manifestações clínicas da doença (sintomáticos) (WEBER; SCHOLL; BAUMGARTNER, 2004; WOLF, 2017).

2.1.3 Fatores responsáveis por falsos positivos e falsos negativos

Pelo fato da triagem para DB ser realizada por teste enzimático direto, os resultados não são influenciados pela ingestão de biotina. Aproximadamente 50% dos resultados falso-positivos (baixa atividade da biotinidase) são devidos a prematuridade ou a manipulação incorreta das amostras, possivelmente por exposição a condições climáticas desfavoráveis, como calor ou umidade excessivos. O efeito de transfusões sanguíneas na triagem neonatal para DB não está estabelecido (STROVEL *et al.*, 2017).

A presença de icterícia ou de doenças graves no fígado podem ter papel inibidor da enzima, ocasionando baixa atividade enzimática, tanto em recém-nascidos a termo quanto em

prematturos ou pequenos para a idade gestacional (LARA et al., 2014; SUORMALA; WICK; BAUMGARTNER, 1988).

Pacientes em tratamento com sulfonamidas podem ter resultados falso-negativos quando se utiliza o método colorimétrico, uma vez que as sulfonamidas são aminas aromáticas que reagem com substâncias químicas utilizadas no teste, desenvolvendo cor. Para eliminar erros, recomenda-se que nesses casos sejam realizadas duas determinações simultaneamente, com e sem substrato (HEARD *et al.*, 1986).

2.2 Deficiência de biotinidase

2.2.1 Definição

A deficiência de biotinidase (OMIM#253260) é doença metabólica hereditária, autossômica recessiva, causada por mutações no gene biotinidase (*BTD*), localizado no cromossomo 3 (3p25.1) (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010; WOLF *et al.*, 1983). Apresenta expressão fenotípica diversa em razão de deficiência variável da enzima biotinidase. Como consequência, ocorre depleção da biotina endógena devido à incapacidade do organismo em fazer a reciclagem da vitamina ou de usar a biotina ligada a proteína fornecida pela dieta. Ocorre, então, deficiência múltipla da atividade de carboxilases (DMC) na forma tardia ou juvenil (HYMES; WOLF, 1996; WOLF et al., 1985).

A DMC descreve um grupo de doenças metabólicas hereditárias que são caracterizadas pela deficiência de atividade das carboxilases dependentes de biotina. Com base no início e nas características clínicas, a DMC foi categorizada em duas principais formas. A DMC neonatal ou de início precoce caracteriza-se por deficiência enzimática primária na atividade da biotina holocarboxilase sintetase, enzima que compreende a biotina ligada em covalência com várias apocarboxilases que formam a holoenzima. A DMC tardia ou juvenil caracteriza-se pela deficiência de atividade da enzima biotinidase (WOLF et al., 1985).

A DB é classificada de acordo com a atividade enzimática no soro: DB profunda (até 10% da atividade média de referência) e DB parcial (10% a 30% da atividade média de referência) (WOLF et al., 1985). Os resultados da dosagem enzimática são classificados em quatro faixas: sugestivo de DB profunda, sugestivo de DB parcial, sugestivo de heterozigose e normal, sendo a classificação determinante na decisão terapêutica a ser adotada.

2.2.2 Aspectos metabólicos

2.2.2.1 Biotina

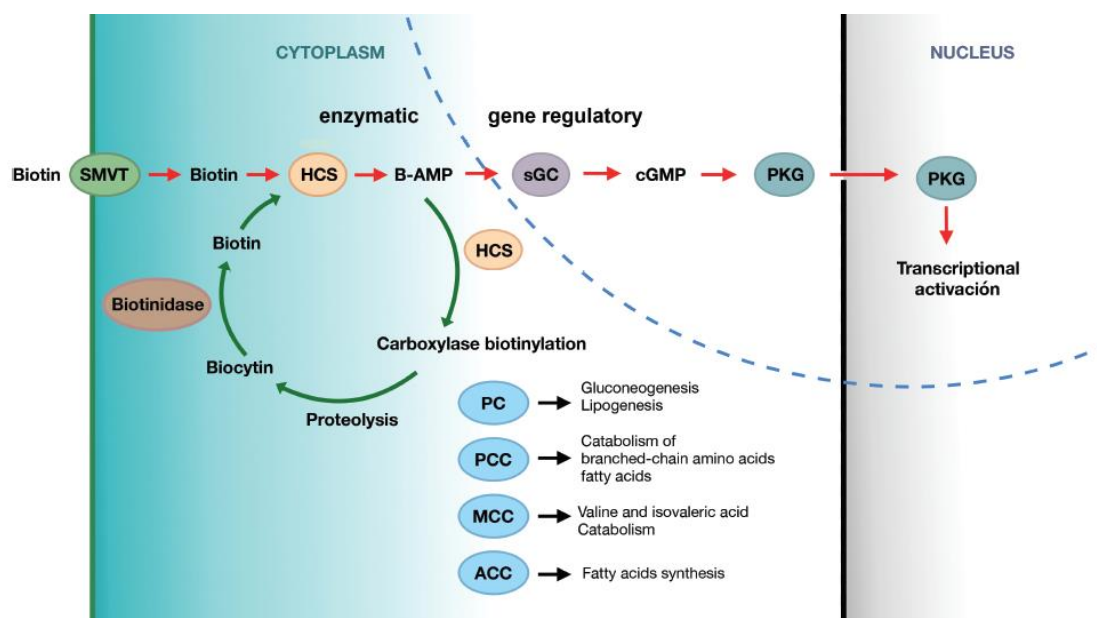
A biotina, nutriente essencial para o ser humano, é vitamina hidrossolúvel, envolvida em importantes processos metabólicos como a gliconeogênese, síntese de ácidos graxos e catabolismo de vários aminoácidos de cadeia ramificada. A biotina não é sintetizada pelos seres humanos, sendo necessário obtê-la pela dieta, embora na maioria dos alimentos ela esteja presente como uma vitamina ligada às proteínas, não estando prontamente disponível para o metabolismo celular. Outra forma de obtenção da biotina se dá por mecanismo multienzimático, conhecido como *turnover* das carboxilases ou ciclo da biotina (figura 1, setas verdes): holocarboxilase-sintetase (HCS); biotinila-5-carboxilase, dependente de biotina; e as que são sintetizadas como apocarboxilases inativas: piruvato-carboxilase (PC), importante na gliconeogênese; propionil-CoA-carboxilase (PCC), importante para o catabolismo da isoleucina, treonina, valina e metionina; metilcrotonil-CoA-carboxilase (MCC), que atua no catabolismo da leucina e ácido isovalérico; e acetil-CoA-carboxilase (ACC-1 e ACC-2), responsável pela oxidação e síntese de ácidos graxos (GRAVEL; NARANG, 2005; HYMES; WOLF, 1996; LÉON-DEL-RIO, 2019).

A biotinilação das apocarboxilases pela HCS compreende duas etapas: ativação da biotina pela adenosina trifosfato (ATP), que resulta na formação de um composto intermediário biotinil-adenilato (B-AMP). Posteriormente, o B-AMP é utilizado pela HCS para ligar covalentemente a biotina a um aminoácido lisina específico localizado dentro da sequência Met-Lys-Met que é altamente conservada em todas as carboxilases, transformando-as em carboxilases enzimaticamente ativas. O passo final da degradação proteolítica das carboxilases endógenas dependentes da biotina e a subsequente hidrólise dos peptídeos biotinilados ou da biocitina é feito pela biotinidase presente no plasma sanguíneo e no citoplasma celular. Resulta na liberação da biotina livre, a qual pode ser novamente reciclada (LÉON-DEL-RIO, 2019).

Estudos têm sugerido que a biotina possa atuar também na regulação da expressão gênica, o que foi derivado de duas observações diferentes. Primeiro, a privação de biotina em diferentes modelos experimentais mostrou afetar a transcrição ou atividade enzimática de algumas enzimas hepáticas, incluindo a glucoquinase, piruvato quinase, 6-fosfofrutoquinase e ornitina transcarbamilase. Segundo, em células em cultura e tecidos de rato, a biotina mostrou ter função semelhante ao óxido nítrico, capaz de aumentar a concentração intracelular do segundo mensageiro cGMP por meio da ativação da forma solúvel da enzima guanilato ciclase

(sGC). Nos hepatócitos humanos verificou-se que a biotina regula a expressão do receptor de asialoglicoproteínas (ASGPR) por meio da ativação da sGC e da proteína quinase dependente de cGMP (PKG). A via de transdução do sinal sGC-PKG regula a transcrição de genes que codificam PC, PCC, ACC-1, SMVT e HCS em hepatócitos humanos. Estas observações demonstraram que o biotinil-AMP, o produto de HCS, é a forma transcricionalmente ativa de biotina e indica que a via HCS-sGC-PKG regula a transcrição das enzimas do ciclo da biotina, (Figura 1, setas vermelhas) (LÉON-DEL-RIO, 2019).

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo da biotina e da regulação da expressão gênica dependente de biotina.



No ciclo da biotina, a absorção de biotina é mediada pelo transportador multivitamínico transmembrana dependente de sódio (SMVT). A holocarboxilase sintetase (HCS) transforma biotina em biotinil-AMP durante a biotinilação de PC, PCC, MCC e ACC). A biotinidase libera biotina de peptídeos biotinilados, permitindo que a HCS recicle a biotina. A transcrição dependente de biotina (setas vermelhas) é regulada pelo produto intermediário HCS biotinil-AMP, que é responsável pela ativação sequencial da sGC solúvel e da PKG. As funções enzimáticas e de regulação gênica da biotina são mostradas separadas por uma linha azul pontilhada e curva.

Fonte: Léon-Del-Rio, 2019.

A deficiência de biotina tem sido associada à má absorção intestinal (síndrome do intestino curto), ao uso prolongado de fármacos como anticonvulsivantes e antibióticos, provavelmente por inibir sua absorção intestinal ou acelerar seu catabolismo, ao consumo excessivo de álcool, ao consumo contínuo de ovo cru, pois a clara do ovo contém avidina que se liga fortemente a biotina impedindo a sua absorção, à desnutrição grave em crianças, a erros inatos do metabolismo (deficiência de biotinidade) e à hemodiálise crônica (LARA *et al.*, 2014; ZEMPLINI; HASSAN; WIJERATNE, 2008).

Estudos em animais já comprovaram que a carência de biotina é teratogênica, sendo as malformações mais comuns em ratos a fenda palatina, deformação da mandíbula inferior (micrognatia), microcefalia e sindactilia. Em humanos, existe a possibilidade de que a carência de biotina esteja envolvida em malformações fetais, mas ainda é algo incerto (ZEMPLINI; HASSAN; WIJERATNE, 2008).

2.2.2.2 Biotinidase

Segundo Hymes e Wolf (1996), a enzima biotinidase (BTD; EC 3.5.1.12) foi primeiramente descrita pelo investigador finlandês Jaakko Pispala em sua tese de doutorado (1965). Naquele tempo, o papel da enzima no metabolismo ainda não estava totalmente elucidado.

Hoje já se sabe que a biotinidase tem importância crítica no metabolismo da biotina, conforme já mencionado. Ela catalisa a remoção de biotina da biocitina (ϵ -N-biotinil-L-lisina), produto de degradação das carboxilases. A biotinidase tem importante papel tanto para a reciclagem da biotina endógena, quanto para o processamento da biotina ligada à proteína da dieta. Atividade significativa da biotinidase é normalmente encontrada no fígado, nos rins, no intestino e no soro (HYMES; WOLF, 1996; WOLF *et al.*, 1983, WOLF *et al.*, 1985).

2.2.3 Aspectos genéticos

2.2.3.1 Gene *BTD*

O gene *BTD* humano (OMIN#609019) que codifica a biotinidase é um gene constitutivo e está localizado, como já referido, no cromossomo 3p25. Já foi clonado, sequenciado e caracterizado (COLE *et al.*, 1994; COLE *et al.*, 1994).

A biotinidase (BTD; NP_000051.1) é composta por 543 aminoácidos, tem massa molecular de 56,771 Da, pertence à superfamília das enzimas nitrilases, que consistem de 12 famílias de amidases, N-aciltransferases e nitrilases. Alguns membros da superfamília nitrilase (vanins-1, 2 e 3) compartilham significativas similaridades de sequência com a BTD (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010; ZEMPLINI; HASSAN; WIJERATNE, 2008).

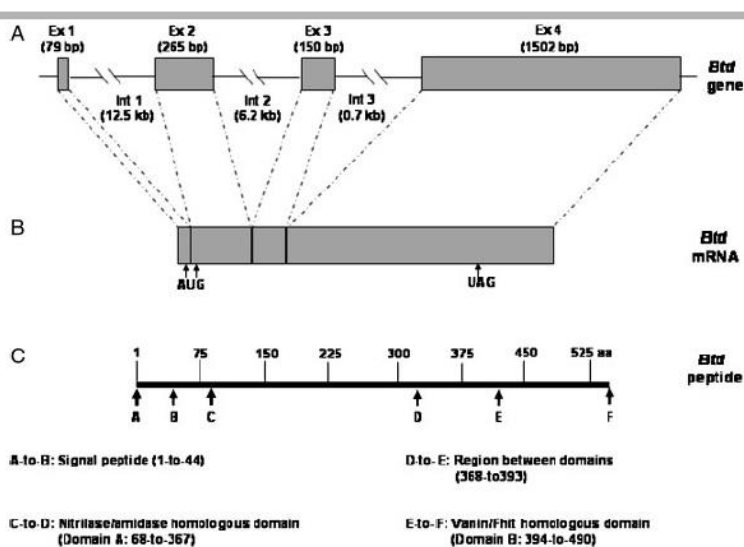
A organização genômica do gene *BTD* (BTD; NG_008019) e o RNAm transcrito (cDNA) foram descritos em 1998 por Cole e colaboradores (KNIGHT *et al.*, 1998; PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010). Esquema da organização do gene *BTD* é mostrado na figura 2.

O RNAm (NM_000060.2) é composto por 4 éxons, de 79, 265, 150 e 1.502 bases, respectivamente de 1 a 4. O íntron 1, de 12,5 kb (o mais longo), está localizado entre os éxons 1 e 2; íntron 2, de 2.6kb, está entre os éxons 2 e 3; e o íntron 3, de 0,7 kb que está entre os éxons 3 e 4. Existem dois potenciais códons AUG iniciadores da tradução, um no éxon 1 e o outro no éxon 2. Esses dois códons iniciadores podem codificar dois peptídeos sinalizadores, um de 21 e outro de 41 aminoácidos. O mais curto corresponde ao motivo da maioria dos peptídeos sinalizadores de sinal. Há evidências de pelo menos três sítios de *splicing* alternativo. O códon de parada UAG está localizado no éxon 4 e sinal de poliadenilação, cerca de 300 bases a 3' do códon UAG (KNIGHT *et al.*, 1998; PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010; ZEMPLIENI; HASSAN; WIJERATNE, 2008).

Utilizando modelagem computacional de relacionados homólogos, nitrilases/amidases cristalizadas e sequências dos aminoácidos da biotinidase, foi possível prever a estrutura tridimensional da proteína biotinidase. A estrutura possui dois domínios: domínio A, maior, homólogo de nitrilase/amidase no centro do peptídeo, que contém a tríade catalítica consistindo de glutamato, lisina e cisteína; domínio B, menor, homólogo de vanin/fhit, com função ainda desconhecida, mas podendo estar relacionado à ligação de biotina. O modelo prevê quais os locais de glicosilação na superfície da enzima e quais cisteínas estão provavelmente envolvidas em ligações dissulfuretos. Além disso, existe uma região aparentemente flexível que conecta os domínios A e B (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010).

Embora existam deficiências na predição da estrutura tridimensional de uma proteína sem dados cristalográficos, devido à marcada homologia entre biotinidase e amidases/nitrilases cristalizadas específicas, a estrutura supra-dimensional provável da biotinidase pode fornecer pistas sobre as relações estrutura-função e o efeito que as várias mutações têm na alteração das atividades das enzimas hidrolase e transferase (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010).

Figura 2 – Organização genômica do gene *BTD*, estrutura do RNAm e o peptídeo enzimático resultante, com as regiões funcionais.



A: O gene da biotinidase abrange mais de 21 kb. A região codificadora (sombreada) consiste de 4 éxons e 3 introns.

B: RNAm transcrito. São mostrados os dois locais de iniciação da tradução, (AUG no éxon 1 e no éxon 2) e o sítio de parada UAG no éxon 4. Supondo que o primeiro sítio de iniciação seja usado, o RNAm codifica um peptídeo de 543 aminoácidos.

C: A proteína da biotinidase com as várias regiões peptídicas correspondentes ao peptídeo sinalizador, domínio homólogo de nitrilases/amidasas (Domínio A), domínio homólogo vanin/fhit (Domínio B) e uma região que conecta os dois domínios.

Fonte: Pindolia, Jordan e Wolf (2010).

2.2.3.2 Variantes que causam deficiência de biotinidase

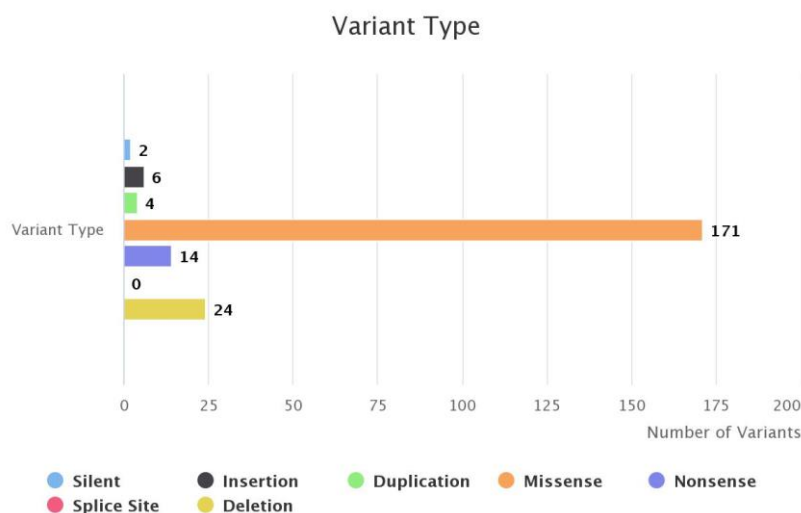
O número de mutações no gene *BTD* tem aumentado no decorrer dos muitos estudos realizados em várias partes do mundo, sendo novas mutações identificadas por muitos desses estudos. De acordo com o banco de dados *BTD database* (http://www.arup.utah.edu/database/BTD/BTD_display.php) já foram descritas mais de 200 variantes, sendo a maioria classificada como patogênica, isto é, que leva à diminuição ou abolição da atividade da biotinidase.

Mutações têm sido encontradas, na grande maioria das vezes, em regiões codificantes, em especial no éxon 4, o mais longo e o que codifica o sítio ativo da enzima. Algumas mutações localizam-se nos sítios de *splicing*, em regiões intrônicas adjacentes aos éxons (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010; PROCTER; WOLF; MAO, 2016).

Já foram identificadas variantes de todos os tipos: deleções, duplicações, inserções e mutações pontuais (*missense*, *nonsense* e silenciosas), sendo a grande maioria do tipo *missense*,

como mostrado na figura 3. É comum a ocorrência de variantes alélicas compostas (duas variantes em *cis*), as quais têm sido confirmadas pelo sequenciamento nucleotídico dos pais de pacientes acometidos (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010).

Figura 3 – Tipos de variantes encontradas no gene *BTD*



Fonte: http://www.arup.utah.edu/database/BTD/BTD_welcome.php (acesso em 01 de abril de 2019.)

Uma rara microdeleção contínua (26 kb), incluindo os éxons 2 a 4 do gene *BTD*, foi primeiramente descrita por Wolf (2016). Trata-se de relato de caso em que essa microdeleção foi detectada em heterozigose na mãe por meio de metodologia de *microarray*. Posteriormente, foi detectada também em heterozigose em exame pré-natal no feto, que também teve o DNA sequenciado para o gene *BTD* completo e não revelou presença de outras variantes. Foi realizado teste enzimático quantitativo da biotinidase no soro dos pais, sendo o resultado do pai dentro da faixa de normalidade e o resultado da mãe na faixa de sugestivo de heterozigoto. Essa microdeleção em homozigose, portanto, deve resultar em perda total da atividade da biotinidase. Ao nascimento a criança não teve a triagem para DB realizada, e não foi realizado o teste enzimático no soro, não sendo possível confirmar o status de sugestivo de heterozigoto na criança.

Senanayake et al (2015) descreveram uma deleção contínua, em homozigose, de três genes adjacentes perfazendo, aproximadamente, 107 kb. Ela inclui todo o éxon 1 do gene *BTD* e foi detectada por metodologia de *microarray* em uma criança sintomática residente no Sri Lanka, Índia. A criança foi diagnosticada com DB total e teve o tratamento com biotina

iniciado. A deleção foi descoberta depois de várias tentativas, sem sucesso, de sequenciar o éxon 1, sendo os éxons 2-4 sequenciados com sucesso e sem alterações. A deleção inclui todo o éxon 1 do gene *BTD*, todo o gene *HACL1* (OMIN#604300) e uma pequena porção ao final 5' do gene *COLQ* (OMIN#603033). Os pais eram consanguíneos e ambos tiveram a deleção detectada em heterozigose.

Mutações não-exônicas, como anteriormente referido, já foram descritas por alguns autores. Mühl et al (2001) descreveram mutação G>A na posição 12.236 (sequência AFO18630, do EMBL), na região 3' não-codificante (UTR) do gene *BTD*. Essa variante foi detectada em três irmãos, em estado heterozigoto composto com outra variante (p.R157H). A atividade enzimática residual dos três irmãos foram de 3,4, 3,5 e 4,6%. A mãe e uma irmã, ambas heterozigotas para essa variante, apresentavam atividade enzimática em torno de 60%.

Já Li et al (2014) descrevem uma deleção de uma única base no íntron 2 na posição nucleotídica -15 ao início do éxon 3, descrita como c.310-15delT. Conforme predição *in silico* realizada pelos autores, é esperado que esta variante cause deficiência parcial.

Durante o estudo de coorte “BabySeq Project” em que é realizado o sequenciamento do exoma e analisados os genes fortemente associados a doenças pediátricas, foi identificada uma alteração, que não havia sido descrita anteriormente, na região de *splicing* do íntron 1 (c.44+1G>A), em heterozigose composta com a variante p.R538C, já bem caracterizada como patogênica. Apesar da mutação intrônica estar na região de *splicing* do exon 1, o que aparentemente não causaria danos na produção da proteína BTM, o recém-nascido teve o diagnóstico confirmado para DB parcial pelo teste enzimático no soro e o estudo concluiu que esta nova mutação intrônica seria provavelmente patogênica (MURRY *et al.*, 2018).

Variantes do tipo silenciosa, geralmente *missense*, também têm sido encontradas no gene *BTD*. Embora haja substituição nucleotídica, não há substituição de aminoácido, sendo obviamente preservada a atividade enzimática (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010).

A variante p.D444H (c.1330G>C), considerada a mais comum em todas as populações analisadas, tem frequência em torno de 4% na população em geral. Essa variante, isoladamente, é considerada funcionalmente “branda”, mas combinada com outra variante que cause DB profunda no outro alelo resulta em DB parcial. Esta alta frequência, combinada ao fato de estar associada à DB parcial, faz com que a p.D444H se assemelhe à variante de Duarte D2 N314D, observada em pacientes com galactosemia (PROCTER *et al.*, 2013; SWANGO *et al.*, 1998).

Dentre as cinco variantes mais comuns em pacientes com DB profunda nos EUA figuram p.Q456H (c.1368A>C), o haplótipo c.1330G>C;511G>A (p.D444H;A171T), a p.C.33Ffs*36 (c.98_104delinsTCC), a p.D252G (c.755A>G) e a p.R538C (c.1612C>T). Na

população de triagem neonatal, maior variabilidade genotípica tem sido demonstrada comparativamente à do grupo de pacientes sintomáticos. Duas variantes, dentre as mais comuns entre os pacientes da triagem neonatal (p.D444H;A171T e p.Q456H), não foram detectadas em pacientes sintomáticos (NORRGARD *et al.*, 1999).

Estudo realizado no Brasil por Borsatto et al (2017) apontaram que as variantes mais comuns nos pacientes com DB foram a p.D444H (c.1330G>C), p.D252G (c.755A>G) e o haplótipo c.1330G>C;511G>A (p.D444H;A171T) com frequências de 46,7%, 5,8% e 3,6%, respectivamente. Já Neto et al (2004) identificaram as variantes p.C.33Ffs*36 (c.98_104delinsTCC), o haplótipo c.1330G>C;511G>A (p.D444H;A171T) e a p.D252G (c.755A>G) como as mais comuns em uma população de triagem neonatal de alguns programas do setor privado no Brasil.

A variante p.A171T (c.511G>A) tem sido descrita somente em *cis* com a variante p.D444H (c.1330G>C), não sendo encontrada isoladamente (NORRGARD et al., 1998).

Em todos os pacientes em que se confirmou a DB, foram encontradas variantes em ambos os alelos. Quando não foram encontradas variantes nos dois alelos, atribuiu-se tal exceção à falta de sensibilidade do sequenciamento para detectar deleções mais extensas ou a erro na dosagem enzimática, casos ditos falso-positivos (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010).

Embora a maior parte das variantes tenha sido descrita por investigadores dos EUA (PROCTER; WOLF; MAO, 2016), novas variantes têm sido relatadas em várias outras regiões do mundo, como no Canadá (GANAVAPARU *et al.*, 2015), Hungria (LÁSZLÓ *et al.*, 2003; MILÁNKOVICS *et al.*, 2007), Turquia (YLMAZ *et al.*, 2018), Suécia (OHLSSON *et al.*, 2010), Grécia (THODI *et al.*, 2011), Argélia (TIAR *et al.*, 2014), Espanha e Índia (IQBAL *et al.*, 2010) e, inclusive, no Brasil (BORSATTO *et al.*, 2017; NETO *et al.*, 2004; LARA *et al.*, 2015).

2.2.4 Correlação do fenótipo bioquímico com o genótipo

A correlação do genótipo com o fenótipo clínico é muito difícil de se avaliar devido à grande variedade de sintomas, até mesmo entre membros de uma mesma família. Além disso, algumas crianças com DB profunda só se tornam sintomáticas na adolescência, embora apresentem o mesmo genótipo de crianças cujos sintomas surgem na primeira infância (HYMES; STANLEY; WOLF, 2001). Muitos autores vêm tentando correlacionar o fenótipo bioquímico com o genótipo, até porque a maior parte dos dados atualmente disponíveis provém dos programas de triagem neonatal e as crianças diagnosticadas pela triagem dificilmente apresentam sintomatologia, pois iniciam precocemente o tratamento com biotina.

Inserções, deleções ou variantes *nonsense* geralmente resultam em completa ausência de atividade enzimática, enquanto que variantes do tipo *missense* podem ou não resultar em perda ou diminuição de atividade enzimática (WOLF, 2016). A maior parte das variantes associa-se à DB profunda, na qual há perda de mais de 90% da atividade enzimática (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010).

Indivíduos com um dos alelos contendo variante associada com DB profunda e o outro alelo normal são considerados heterozigotos para DB profunda. Obviamente essa é a situação dos pais de indivíduos com DB profunda (WOLF, 2016).

A variante mais comum, a p.D444H (c.1330G>C), em homozigose, resulta na perda de aproximadamente 50% da atividade enzimática, de forma semelhante a indivíduos heterozigotos com um único alelo determinante de variantes associadas a DB profunda. Já em heterozigose simples, a p.D444H (c.1330G>C) resulta na perda de aproximadamente 25% da atividade enzimática do indivíduo (SWANGO *et al.*, 1998; WOLF, 2016). A figura 4 sistematiza a base molecular da DB.

A combinação da p.D444H (c.1330G>C) com uma variante associada a DB profunda é considerada a maior causa de DB parcial em todo o mundo (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010; SWANGO *et al.*, 1998).

Figura 4 – Base Molecular da Deficiência de Biotinidase

| DB (recebem biotina) | | | Indivíduos não afetados (não recebem biotina) | | | |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--|---------------------------|-----------------------|----------|
| DB Profunda | DB Parcial | DB Parcial | Semelhante a heteroz. | Heteroz. | Semelhante a "normal" | "Normal" |
| Alelo mutante DB profunda | Alelo mutante DB profunda | Alelo mutante DB profunda | p.D444H | Alelo mutante DB profunda | p.D444H | Normal |
| + | + | + | + | + | | |
| Alelo mutante DB profunda | Alelo mutante DB parcial | p.D444H | p.D444H | Alelo normal | Alelo normal | Normal |

Fonte: Adaptado de Borsatto et al (2014).

2.2.5 Epidemiologia

Com base nos dados de 36 programas de triagem neonatal no ano de 1990, referente a 14 países, e incluindo um total de 8.532.617 recém-nascidos triados, a incidência mundial da DB profunda foi estimada em 1:112.271 (1:85.000 a 1:145.000; IC 95%), a incidência mundial da DB parcial em 1:129.282 (1:112.700 a 1:177.000; IC 95%) e a incidência de DB profunda e parcial combinada foi estimada em 1:60.089 (1:49.500 a 1:73.100; IC 95%). A frequência estimada do alelo para DB foi de 0,004 sendo 1:123 indivíduos heterozigotos para DB (WOLF, 1991).

Nos EUA, a incidência da DB profunda é de 1:80.000 nascidos-vivos e a incidência da DB parcial entre 1:31.000 a 1:40.000, embora possa variar de estado para estado. A maioria dos pacientes relatados clinicamente é de descendência europeia (STROVEL *et al.*, 2017).

Na Europa, a partir dos dados de triagem neonatal de nove países, incluindo 1.321.989 recém-nascidos, a incidência combinada de DB foi estimada em 1:47.486 (LOEBER, 2004).

Em países onde a consanguinidade é mais frequente, a incidência de DB é mais elevada, como na Turquia, onde a DB combinada é de 1:7.116 nascidos-vivos, considerada uma das mais altas do mundo (KARACA *et al.*, 2015). Nos Emirados Árabes Unidos, onde de forma geral as doenças autossômicas recessivas são muito frequentes, não há dados de incidência isolada da DB, sendo que no período de 2011-2014 a prevalência de erros inatos do metabolismo foi de 1:2.474 (AL-JASMI *et al.*, 2016).

No Brasil, os poucos estudos apresentam resultados discordantes. Pesquisa realizada por Neto *et al.* (2004), com amostras de sangue provenientes de 225.136 recém-nascidos de vários programas de triagem neonatal do setor privado de alguns estados, no período de 1995-1999, resultou na incidência da DB combinada em 1:9.000.

Em estudo realizado no Paraná com 125.000 recém-nascidos triados durante 8 meses (cobertura de 90%), a prevalência da DB combinada foi de 1:62.500 (PINTO *et al.*, 1998). Em outro estudo realizado também no Paraná, estimou-se a prevalência da DB combinada no município de Maringá, entre 20.529 recém-nascidos triados pelo PNTN no período de 2001-2006, em 1:6.843 (LUZ *et al.*, 2008).

Em Minas Gerais, conforme já mencionado, foi realizado estudo piloto com duração de 10 meses, incluindo 182.891 recém-nascidos (cobertura de 94,8% no estado). A incidência combinada de DB parcial e profunda foi de 1: 22.861 (LARA *et al.*, 2015).

2.2.6 Manifestações clínicas

2.2.6.1 Deficiência de biotinidase profunda

Quando não tratadas precocemente, entre o segundo e quinto mês de vida, as crianças com DB profunda podem apresentar sintomas neurológicos e cutâneos. Os sintomas só aparecem após a depleção dos estoques de biotina acumulados durante a vida intrauterina. Há casos em que os sintomas aparecem mais precocemente, como na primeira semana de vida, e outros com início mais tardio, na adolescência. Muitas crianças, quando não tratadas precocemente, desenvolvem atraso no desenvolvimento, perda ou deficiência auditiva e problemas visuais (LARA *et al.*, 2014).

A perda auditiva sensorial ocorre em aproximadamente 75% das crianças com DB profunda, o que é muito mais comum do que se supunha anteriormente. A gravidade da perda de audição é bem variável e geralmente é irreversível, mesmo após início do tratamento com biotina (WOLF; SPENCER; GLEASON, 2002).

Mais de 70% das crianças apresentam convulsões, hipotonia, erupção cutânea ou alopecia em algum momento antes do diagnóstico. Em torno de 50% das crianças apresentam ataxia, atraso no desenvolvimento, conjuntivite e problemas visuais, incluindo atrofia óptica. Os indivíduos afetados podem ter características que variam de múltiplos episódios leves de convulsões e ataxia, até comprometimento metabólico grave, que pode resultar em coma ou morte (WOLF, 1991).

Bioquimicamente, indivíduos não tratados podem apresentar cetoacidose metabólica, acidose láctica e/ou hiperamonemia. Outras anormalidades metabólicas são bem variáveis e as crianças afetadas, sintomáticas ou não, podem apresentar cetoacidose ou acidúria orgânica (WOLF *et al.*, 1985).

2.2.6.2 Deficiência de biotinidase parcial

Antes do início da triagem neonatal para DB, a deficiência de biotinidase parcial era desconhecida. Inicialmente foi considerada uma variante sem consequências clínicas. Mais tarde, vários estudos descreveram crianças com DB parcial que tinham desenvolvido sintomas quando submetidas a situações de estresse, como infecções e desnutrição. Alguns sintomas foram resolvidos após iniciado o tratamento com biotina. A maior susceptibilidade para o

desenvolvimento de sintomas em alguns indivíduos ainda não está muito clara (STROVEL *et al.*, 2017).

Indivíduos sintomáticos com DB parcial podem ter sintomas menos graves como erupções cutâneas e alopecia até quadros mais graves como hipotonia, convulsões e atraso no desenvolvimento. De forma geral, os sintomas desses indivíduos são mais leves do que os observados em indivíduos com DB profunda. As manifestações podem aparecer tanto na infância quanto na idade adulta. O que causa o aparecimento dos sintomas em alguns indivíduos e não em outros não está elucidado, mas a literatura demonstra claramente que esses indivíduos podem tornar-se sintomáticos em algum momento de sua vida, sendo algumas manifestações irreversíveis mesmo com o início do tratamento, como observado nos indivíduos com DB profunda (WOLF, 2015).

2.2.6.3 Casos assintomáticos

Existem relatos de adultos com DB profunda que só foram identificados depois que tiveram seus filhos diagnosticados pela triagem neonatal. Esses adultos permaneceram assintomáticos, apesar de nunca terem sido tratados com biotina. Vários deles passaram por muitas avaliações clínicas, incluindo histórias detalhadas sobre a dieta ingerida, mas não se demonstraram quaisquer características clínicas ou bioquímicas patológicas. Nenhum deles apresentava variante nula, aquelas em que a produção de BTD é inexistente, mas todos tinham atividade enzimática na faixa de deficiência profunda, com alguma atividade residual (STROVEL *et al.*, 2017).

Esses indivíduos com DB profunda que não fazem uso da suplementação com biotina e permanecem assintomáticos frequentemente possuem mutações que causam sintomas em outros indivíduos com o mesmo genótipo. É possível que em algum momento esses indivíduos possam se tornar sintomáticos ou, então, possuam algum fator epigenético desconhecido que faz com que permaneçam assintomáticos (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010).

2.2.7 Métodos diagnósticos

O diagnóstico da DB é realizado por meio da dosagem da atividade da enzima biotinidase no soro. O método mais amplamente utilizado é o colorimétrico, baseado no teste enzimático em que se utiliza substrato artificial como o N-biotil p-aminobenzoato (BPABA). Esse método também é a base para os testes de triagem neonatal, os quais foram adaptados para

serem realizados em amostras de sangue seco em papel filtro e em microplacas (HEARD; McVOY; WOLF, 1984; PETTIT; AMADOR; WOLF, 1989).

A atividade da biotinidase pode ser determinada utilizando técnicas fluorescentes com biotina-6-aminoquinolina como substrato artificial. Apesar de ser mais caro, esse substrato também pode ser adaptado para uso em testes com sangue seco em papel filtro. Existem outros métodos para se determinar a atividade da biotinidase, como a medida da liberação de biotina a partir da biocitina, utilizando outros derivados biotinilados fluorescentes e análogos biotinilados radioisotópicos, mas são mais onerosos e exigem mais tempo de processamento e nem sempre são adaptáveis para utilização na triagem neonatal (STROVEL *et al.*, 2017).

A triagem neonatal primária é capaz de identificar as crianças com DB parcial e profunda. O teste enzimático confirmatório em soro normalmente é suficiente para identificar crianças com DB profunda. Mas pode haver falsos negativos ou, mais frequentemente, falso positivos, se o laboratório não utilizar controles apropriados conforme recomendação de laboratórios de referência (COWAN; BLITZER; WOLF, 2010). Entretanto, em alguns casos, a atividade enzimática não diferencia adequadamente os pacientes com DB parcial daqueles que estão na faixa de sugestivo de heterozigoto, sendo necessária a análise de mutações para se confirmar o diagnóstico (STROVEL *et al.*, 2017; WOLF, 2010).

Essencialmente, a maioria dos indivíduos com DB parcial possui a variante p.D444H em associação com variantes subjacentes a DB profunda no outro alelo. A pesquisa da p.D444H juntamente com as cinco variantes de DB profunda mais comuns numa determinada população pode ser uma ferramenta útil. Se a variante p.D444H é encontrada na ausência da p.A171T (haplótipo) e associada a variante que leve à DB profunda, é provável que este indivíduo tenha DB parcial (WOLF, 2010).

Como o gene *BTD* tem uma organização simples e relativamente pequeno (543 aminoácidos e quatro éxons), é factível a realização de sequenciamento nucleotídico completo para casos que necessitem de confirmação. No caso de o sequenciamento não detectar mutações pontuais no gene e se forem descartados eventuais problemas técnicos ou amostrais, pode-se aventar a possibilidade de deleções no gene, as quais não são detectáveis pelo sequenciamento (STROVEL *et al.*, 2017). Por meio de metodologias de análise por *microarray* é possível detectar a presença de deleções no gene *BTD* (SENANAYAKE *et al.*, 2015; WOLF, 2016), mas é um método ainda pouco utilizado devido ao alto custo.

Programas de triagem neonatal de alguns estados nos EUA, bem como em outros países, já incluíram o sequenciamento nucleotídico como método complementar de rotina para confirmação dos casos diagnosticados pela triagem (STROVEL *et al.*, 2017).

2.2.8 Tratamento

O tratamento da DB consiste na ingestão de doses farmacológicas de biotina livre durante toda a vida. A dosagem varia entre 5 e 20 mg de biotina por dia, independentemente da idade. Essa dosagem foi determinada empiricamente a partir de experiências no tratamento de crianças com várias formas de deficiência múltipla de carboxilases (DMC), há mais de 30 anos (WOLF, 2010).

O monitoramento dos ácidos orgânicos urinários é uma forma de se verificar a eficácia do tratamento e ajustar a dosagem de biotina. Concentração elevada de ácidos orgânicos é consistente com DMC. Se a criança estiver sendo tratada com biotina, indica a necessidade de aumentar a dose. Segundo a literatura, cerca de 20% das crianças com DB não tratada podem apresentar excreção normal de ácidos orgânicos quando sintomáticas. No entanto, o monitoramento de ácidos orgânicos urinários é o único método útil para se determinar se a dosagem de biotina está sendo suficiente (WOLF, 2010).

A suplementação de biotina previne, em praticamente todos os casos, o desenvolvimento de sintomas em crianças pré-sintomáticas com deficiência profunda. Além disso, todas as crianças sintomáticas com DB profunda que foram tratadas com doses farmacológicas de biotina (5-20 mg por dia) mostraram melhora clínica. As convulsões e ataxia cessam em algumas horas ou dias e as manifestações cutâneas geralmente regridem em algumas semanas. Dependendo da gravidade do comprometimento metabólico e neurológico, muitas crianças com atraso no desenvolvimento alcançam rapidamente novos marcos funcionais ou recuperaram aqueles que foram perdidos (SCHUBIGER *et al.*, 1984; STROVEL *et al.*, 2017).

Crianças com DB profunda que não aderiram à terapia com biotina, sem intenção ou deliberadamente, desenvolvem sintomas dentro de algumas semanas. Isso mostra claramente a importância do diagnóstico precoce para início do tratamento (SCHUBIGER *et al.*, 1984; STROVEL *et al.*, 2017).

Muitos estudos têm mostrado resultados clínicos excelentes com o tratamento de indivíduos com DB profunda e parcial (MÖSLINGER *et al.*, 2003; SZYMANSKA *et al.*, 2015; WEBER; SCHOLL; BAUMGARTNER, 2004; WOLF, 2017). Wolf (2015) faz algumas considerações sobre a triagem neonatal e tratamento das crianças identificadas tanto com a DB profunda quanto a DB parcial. Recomenda tratar todas as crianças identificadas com DB parcial de forma a se evitar a possibilidade de aparecimento de sintomas.

As controvérsias sobre o tratamento de crianças com DB parcial é similar ao que ocorre com a identificação e tratamento de indivíduos com a variante de Duarte da galactosemia. Tais

indivíduos possuem em torno de 15-25% da atividade enzimática média normal, o que é semelhante à fração da atividade normal daqueles indivíduos com DB parcial. Alguns estudos mostraram menos morbidade em indivíduos com a variante Duarte que foram tratados com uma dieta livre de galactose, em relação àqueles com dieta sem restrição. No entanto, os efeitos podem ser sutis e difíceis de se perceber. Enquanto isso, indivíduo sintomático para DB parcial exibe sintomas claramente perceptíveis. Um estudo mostrou que pode haver efeitos menos evidentes e sutis no desenvolvimento cognitivo ou no desenvolvimento neurológico naqueles com DB parcial não tratada (WOLF, 2015).

Outra diferença importante entre as duas enfermidades é o custo e facilidade de tratamento. Um indivíduo com DB parcial requer apenas dose diária de biotina, sem alterações na dieta. O tratamento de uma criança com DB é muito menos perturbador do que o tratamento de uma criança com a variante Duarte de galactosemia. Isso geralmente se torna mais evidente quando a criança atinge a idade escolar. Como a maioria dos programas de triagem neonatal já realiza a triagem para DB, não se tem conhecimento suficiente sobre a história natural de indivíduos com DB parcial não tratados (WOLF, 2015).

Com a incorporação da triagem neonatal para DB aos programas de triagem em vários países, a lista de mutações associadas a DB não para de aumentar e a oportunidade de serem coletadas informações sobre indivíduos sintomáticos para correlação com o genótipo praticamente desaparece. Em vista disso, é assumido que se um indivíduo tem DB profunda, há risco de desenvolvimento de sintomas em algum momento, portanto necessita de tratamento com biotina. Da mesma forma têm sido considerados os indivíduos com DB parcial.

Felizmente, não há relatos de efeitos colaterais do tratamento com biotina (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010). Contudo, o uso de altas doses de biotina pode interferir nos resultados de testes laboratoriais que utilizam a reação biotina-estreptavidina em seu desenho. Por esse motivo, é recomendável que os laboratórios incluam nas informações de preparo de exames de todos os testes que utilizam a reação e que o uso da biotina seja suspenso 72 horas antes da coleta de sangue. Conforme relatado por Wolf (2019), há interferências, principalmente, em dosagens hormonais como nos exames realizados para avaliação de função da tireoide (TSH, T4, T4 livre e T3). Os pacientes em uso de biotina podem apresentar resultados compatíveis com hipertireoidismo, mas sem nenhuma manifestação clínica. Alguns exames para doenças infecciosas, como hepatites e HIV, e para marcadores de doenças cardíacas e tumorais também utilizam a reação biotina-estreptavidina. O uso de biotina pode levar a diagnósticos errados (dosagens falsamente altas ou baixas) e, dessa forma, induzir a tratamentos inapropriados. Por esse motivo a FDA (*Food and Drug Administration*) emitiu em 2017 um alerta para o público,

profissionais de saúde, profissionais de laboratórios e empresas desenvolvedoras de testes laboratoriais informando da possibilidade de ocorrerem erros de diagnósticos por conta do uso da biotina (WOLF, 2019).

2.3 Referências Bibliográficas

1. Al-Jasmi FA, Al-Shamsi A, Hertecant JL, Al-Hamad SM, Souid AK. Inborn Errors of Metabolism in the United Arab Emirates: Disorders Detected by Newborn Screening (2011-2014). *JIMD Rep.* 2016; 28:127-135.
2. Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Lima SE, Carvalho MRS, Fonseca PAS, Camelo JS, et al. Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. *PLoS One.* 2017; 12(5):e0177503.
3. Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Pinto LL, Luca GR, Carvalho FL, Souza CF, et al. Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 Brazilian patients. *BMC Med Genet.* 2014; 15:96.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à saúde. Triagem neonatal biológica: manual técnico. 1. ed. Brasília – DF; 2016.
5. Carroll AE, Downs SM. Comprehensive cost-utility analysis of newborn screening strategies. *Pediatrics.* 2006; 117(5):S287-95.
6. 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.
7. Cole H, Weremowicz S, Morton CC, Wolf B. Localization of serum biotinidase (BTD) to human chromosome 3 in band p25. *Genomics.* 1994; 22(3):662-3.
8. Cowan TM, Blitzer MG, Wolf B; Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency. *Genet Med.* 2010; 12(7):464-70.
9. Dhondt JL. Neonatal screening: from the 'Guthrie age' to the 'genetic age'. *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30(4):418-22.
10. Gannavarapu S, Prasad C, DiRaimo J, Napier M, Goobie S, Potter M, et al. Biotinidase deficiency: Spectrum of molecular, enzymatic and clinical information from newborn screening Ontario, Canada (2007-2014). *Mol Genet Metab.* 2015; 116(3):146-51.
11. Gravel RA, Narang MA. Molecular genetics of biotin metabolism: old vitamin, new science. *J Nutr Biochem.* 2005; 16(7):428-31.
12. Heard GS, McVoy JRS, Wolf B. A screening method for biotinidase deficiency in newborns. *Clin Chem.* 1984; 30(1):125-7.

13. Heard GS, Wolf B, Jefferson LG, Weissbecker KA, Nance WE, McVoy JRS, et al. Neonatal screening for biotinidase deficiency: results of a 1-year pilot study. *J Pediatr*. 1986; 108(1):40-6.
14. Hymes J, Stanley CM, Wolf B. Mutations in BTBD9 causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat*. 2001; 18(5):375-81.
15. Hymes J, Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta*. 1996; 255(1):1-11.
16. Iqbal F, Item CB, Vilaseca MA, Jalan A, Mühl A, Couce ML, et al. The identification of novel mutations in the biotinidase gene using denaturing high pressure liquid chromatography (dHPLC). *Mol Genet Metab*. 2010; 100(1):42-5.
17. Januário JN. Triagem neonatal em Minas Gerais: análise do contexto histórico e político-institucional com enfoque nas estratégias empregadas e resultados alcançados. (Tese de doutorado). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2015.
18. Karaca M, Özgül RK, Ünal Ö, Yücel-Yılmaz D, Kılıç M, Hişmi B, et al. Detection of biotinidase gene mutations in Turkish patients ascertained by newborn and family screening. *Eur J Pediatr*. 2015; 174(8):1077-84.
19. Knight HC, Reynolds TR, Meyers GA, Pomponio RJ, Buck GA, Wolf B. Structure of the human biotinidase gene. *Mamm Genome*. 1998; 9(4):327-30.
20. Lara MT, Aguiar MJB, Gurgel-Giannetti J, Januário JN. Deficiência de biotinidase: aspectos clínicos, diagnóstico e triagem neonatal. *Rev Med Minas*. 2014; 24(3):388-396.
21. Lara MT, Gurgel-Giannetti J, Aguiar MJ, Ladeira RV, Carvalho NO, Del Castillo DM, et al. High Incidence of Biotinidase Deficiency from a Pilot Newborn Screening Study in Minas Gerais, Brazil. *JIMD Rep*. 2015; 24:103-7.
22. László A, Schuler EA, Sallay E, Endreffy E, Somogyi C, Várkonyi A, et al. Neonatal screening for biotinidase deficiency in Hungary: clinical, biochemical and molecular studies. *J Inherit Metab Dis*. 2003; 26(7):693-8.
23. León-Del-Río A. Biotin in metabolism, gene expression, and human disease. *J Inherit Metab Dis*. 2019; doi: 10.1002/jimd.12073. [Epub ahead of print].
24. Li H, Spencer L, Nahhas F, Miller J, Fribley A, Feldman G, et al. Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by newborn screening in Michigan including an unique intronic mutation that alters mRNA expression of the biotinidase gene. *Mol Genet Metab*. 2014; 112(3):242-6.
25. Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30(4):430-8.
26. Luz GS, Carvalho MDB, Pelloso SM, Higarashi IH. Prevalência das doenças diagnosticadas pelo programa de triagem neonatal em Maringá, Paraná, Brasil: 2001-2006. 2008; 29(3):446-53.

27. Milánkovics I, Kámory E, Csókay B, Fodor F, Somogyi C, Schuler A. Mutations causing biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in Western Hungary. *Mol Genet Metab.* 2007; 90(3):345-8.
28. Möslinger D, Mühl A, Suormala T, Baumgartner R, Stöckler-Ipsiroglu S. Molecular characterisation and neuropsychological outcome of 21 patients with profound biotinidase deficiency detected by newborn screening and family studies. *Eur J Pediatr.* 2003; 162 (Suppl 1):S46-9.
29. Mühl A, Möslinger D, Item CB, Stöckler-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.
30. Murry JB, Machini K, Ceyhan-Birsoy O, Kritzer A, Krier JB, Lebo, et al. BabySeq Project Team. Reconciling newborn screening and a novel splice variant in BTD associated with partial biotinidase deficiency: a BabySeq Project case report. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2018; 4(4).
31. Neto EC, Schulte J, Rubim R, Lewis E, DeMari J, Castilhos C, et al. Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(3):295-9.
32. Norrgard KJ, Pomponio RJ, 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.
33. Norrgard KJ, Pomponio RJ, Swango KL, Hymes J, Reynolds T, Buck GA, et al. Double mutation (A171T and D444H) is a common cause of profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening the the United States. *Hum Mutat.* 1998; 11(5):410.
34. NUPAD: Núcleo de Ações e Pesquisas em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; [atualizado em dezembro de 2018; acesso em 01 de março de 2019]. Disponível em: <http://www.nupad.medicina.ufmg.br/programa-e-aco/es/programa-de-triagem-neonatal-de-minas-gerais/>.
35. Ohlsson A, Guthenberg C, Holme E, von Döbeln U. Profound biotinidase deficiency: a rare disease among native Swedes. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33 (Suppl 3):S175-80.
36. Pettit DA, Amador PS, Wolf B. The quantitation of biotinidase activity in dried blood spots using microtiter transfer plates: identification of biotinidase-deficient and heterozygous individuals. *Anal Biochem.* 1989; 179(2):371-4.
37. Pindolia K, Jordan M, Wolf B. Analysis of mutations causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat.* 2010; 31(9):983-91.
38. Pinto AL, Raymond KM, Bruck I, Antoniuk SA. Prevalence study of biotinidase deficiency in newborns. *Rev Saúde Pública.* 1998; 32(2):148-52.

39. Procter M, Wolf B, Mao R. Forty-eight novel mutations causing biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2016; 117(3):369-72.
40. Procter M, Wolf B, Crockett DK, Mao R. The Biotinidase Gene Variants Registry: A Paradigm Public Database. *G3 (Bethesda)*. 2013; 3(4):727-731.
41. Schubiger G, Caflisch U, Baumgartner R, Suormala T, Bachmann C. Biotinidase deficiency: clinical course and biochemical findings. *J Inherit Metab Dis*. 1984; 7(3):129-30.
42. Senanayake DN, Jasinge EA, Pindolia K, Wanigasinghe J, Monaghan K, Suchy SF, et al. First contiguous gene deletion causing biotinidase deficiency: The enzyme deficiency in three Sri Lankan children. *Mol Genet Metab Rep*. 2015; 2:81-84.
43. Strovel ET, Cowan TM, Scott AI, Wolf B. Laboratory diagnosis of biotinidase deficiency, 2017 update: a technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2017; 19(10):1079.
44. 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.
45. Swango KL, Demirkol M, Hüner 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.
46. Szymańska E, Średzińska M, Ługowska A, Pajdowska M, Rokicki D, Tylki-Szymańska A. Outcomes of oral biotin treatment in patients with biotinidase deficiency - Twenty years follow-up. *Mol Genet Metab Rep*. 2015; 5:33-35.
47. Thodi G, Molou E, Georgiou V, Loukas YL, Dotsikas Y, Biti S, et al. Mutational analysis for biotinidase deficiency of a Greek patients' cohort ascertained through expanded newborn screening. *J Hum Genet*. 2011; 56(12):861-5.
48. Tiar A, Mekki A, Nagara M, Rhouma FB, Messaoud O, Halim NB, et al. Biotinidase deficiency: novel mutations in Algerian patients. *Gene*. 2014; 536(1):193-6.
49. Vallejo-Torres L, Castilla I, Couce ML, Pérez-Cerdá C, Martín-Hernández E, Pineda M, et al. Cost-Effectiveness Analysis of a National Newborn Screening Program for Biotinidase Deficiency. *Pediatrics*. 2015; 136(2):e424-32.
50. Weber P, Scholl S, Baumgartner ER. Outcome in patients with profound biotinidase deficiency: relevance of newborn screening. *Dev Med Child Neurol*. 2004; 46(7):481-4.
51. Wolf B. High doses of biotin can interfere with immunoassays that use biotin-strept(avidin) technologies: Implications for individuals with biotin-responsive inherited metabolic disorders. *Mol Genet Metab*. 2019;127(4):321-324.
52. Wolf B. Successful outcomes of older adolescents and adults with profound biotinidase deficiency identified by newborn screening. *Genet Med*. 2017; 19(4):396-402.

53. Wolf B. First microdeletion involving only the biotinidase gene that can cause biotinidase deficiency: A lesson for clinical practice. *Mol Genet Metab Rep.* 2016; 6:74-6.
54. Wolf B. Biotinidase Deficiency - GeneReviews® [Internet]. Atualizado em junho, 2016. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1322/>. Acesso em 08 de maio de 2019.
55. Wolf B. Why screen newborns for profound and partial biotinidase deficiency? *Mol Genet Metab.* 2015; 114(3):382-7.
56. Wolf B. Clinical issues and frequent questions about biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2010; 100(1):6-13.
57. Wolf B. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 1991; 14(6):923-7.
58. 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.
59. 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.
60. Wolf B, Grier RE, McVoy JRS, Heard GS. Biotinidase deficiency: a novel vitamin recycling defect. *J Inherit Metab Dis.* 1985; 8 (Suppl 1):53-8.
61. Wolf B, Heard GS. Screening for biotinidase deficiency in newborns: worldwide experience. *Pediatrics.* 1990; 85(4):512-7.
62. 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.
63. Yilmaz BS, Mungan NO, Kor D, Bulut D, Seydaoglu G, Öktem M, Ceylaner S. Twenty-seven mutations with three novel pathogenic variants causing biotinidase deficiency: a report of 203 patients from the southeastern part of Turkey. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018; 31(3):339-343.
64. Zempleni J, Hassan YI, Wijeratne SS. Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2008; 3(6):715-724.

3 Objetivos

3.1 Geral

Realizar estudo molecular do gene *BTD* em todos os recém-nascidos diagnosticados com deficiência de biotinidase pelo PTN-MG no período de 01/06/2013 a 31/05/2018 (5 anos).

3.2 Específicos

- Estabelecer a incidência da BD parcial e profunda no estado de Minas Gerais;
- Identificar as variantes presentes nos recém-nascidos diagnosticados pelo teste de triagem neonatal com DB profunda e parcial;
- Estabelecer a frequência relativa das variantes identificadas;
- Estimar a frequência da variante p.D444H na população do PTN-MG;
- Correlacionar os níveis de atividade enzimática da biotinidase (fenótipo bioquímico) com o genótipo encontrado.

4 Materiais e métodos

4.1 Casuística

A casuística consta de todos os pacientes triados pelo PTN-MG com o diagnóstico de deficiência de biotinidase confirmado por meio do teste enzimático quantitativo no soro, nascidos no período entre 01 de junho de 2013 e 31 de maio de 2018 (cinco anos).

Foram excluídas da pesquisa as crianças com testes de triagem neonatal “normal” e aquelas cujos pais ou responsáveis não concordaram em assinar o TCLE (Termo de Consentimento Livre Esclarecido), Anexo A, para participação na pesquisa.

4.2 Amostras de sangue

Todos os recém-nascidos (RNs) triados pelo PTN-MG com resultado alterado para deficiência de biotinidase na primeira amostra de sangue seco em papel filtro foram submetidos a uma segunda colheita de sangue em papel filtro para confirmação. Crianças com as duas amostras alteradas foram convocadas para consulta médica. E as com amostras consideradas inadequadas para o teste (qualidade ruim ou quantidade insuficiente) repetiram o exame que, caso alterado ou inadequado, também resultou em convocação para consulta médica. Para minimizar os riscos de resultados falsos negativos, foi solicitada uma segunda amostra dos RNs retidos em maternidade (baixo peso, prematuridade, entre outros), independentemente do resultado da primeira amostra. Os casos com resultado alterado ou inadequado na segunda amostra foram, também, encaminhados para consulta médica.

No mesmo dia da consulta, foram colhidas amostras para realização do exame quantitativo da atividade da biotinidase no soro e sangue em papel filtro FTA para realização do sequenciamento gênico. Também foram colhidas amostras dos pais, sempre que possível, para realização do exame quantitativo da atividade da biotinidase em soro.

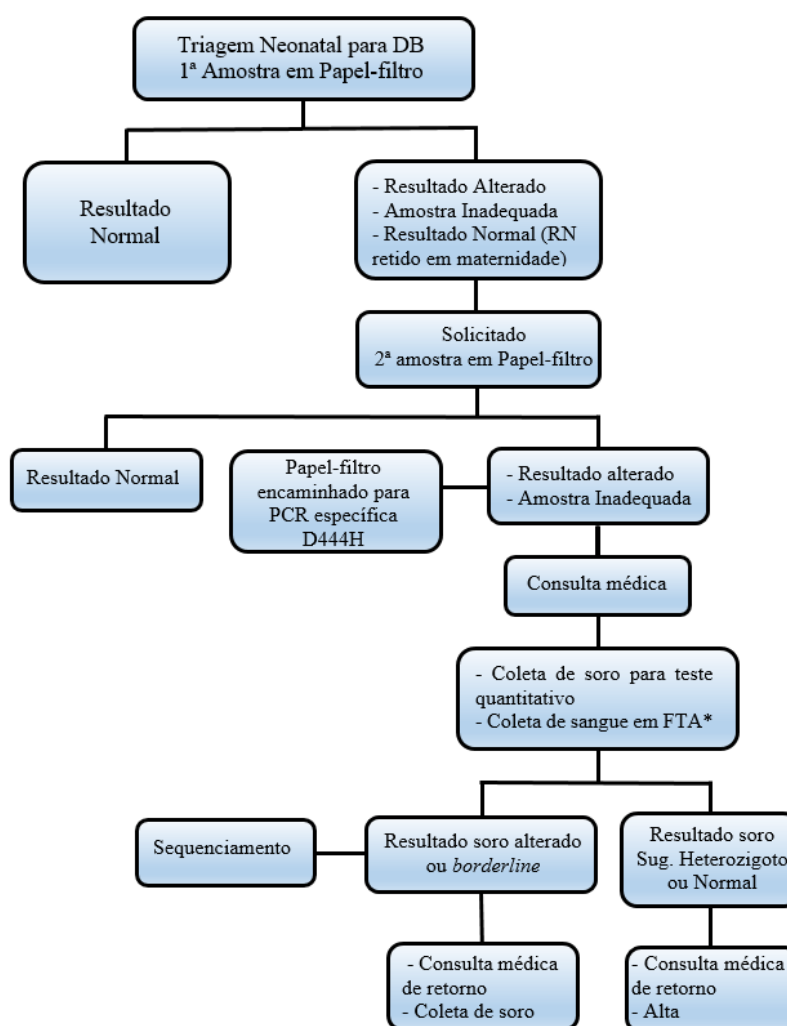
Todas as amostras em papel filtro dos recém-nascidos convocados para consulta médica foram encaminhadas para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Nupad (LGBM) para realização do exame de PCR para a mutação p.D444H, conforme protocolo estabelecido pelo PTN-MG.

As crianças diagnosticadas com deficiência de biotinidase pelo teste enzimático no soro passaram a ter acompanhamento em ambulatório especializado. A confirmação diagnóstica

deu-se mediante, pelo menos, duas dosagens alteradas da atividade enzimática no soro, em momentos diferentes.

O exame de sequenciamento nucleotídico, realizado no LGBM, foi iniciado após a confirmação da deficiência parcial ou profunda da BTB pelo teste enzimático. Exames com valores de até 0,2 nmol/minuto/mL acima do ponto de corte (*cut-off*) estabelecido para a definição de DB parcial pelo teste enzimático no soro foram considerados limítrofes (*borderline*), sendo as amostras também encaminhadas para sequenciamento gênico. Quando foi necessária a definição de segregação alélica no paciente, solicitou-se amostra de sangue dos pais para sequenciamento. O protocolo esquematizado do estudo está apresentado na figura 5.

Figura 5 – Esquema do protocolo do estudo



* Coleta de sangue FTA: em um primeiro momento a coleta era realizada juntamente com a coleta do soro no dia da primeira consulta e o sequenciamento só era realizado se o resultado estivesse alterado. Posteriormente, a coleta passou a ser realizada no dia da consulta de retorno, se o resultado do teste enzimático fosse alterado ou *borderline*.

4.3 Considerações éticas

O estudo molecular do gene *BTD* está sendo realizado como parte do protocolo em desenvolvimento para o diagnóstico da DB pelo PTN-MG. Os pais ou responsáveis legais pelas crianças triadas e identificadas com DB foram informados sobre a realização dos testes moleculares no momento da primeira consulta médica. Eventuais dúvidas em relação aos procedimentos foram dirimidas e foi colhida a assinatura do TCLE para participação na pesquisa.

Os resultados dos exames confirmatórios (teste quantitativo em soro) e moleculares foram encaminhados para o médico responsável pela assistência à criança.

O presente projeto foi aprovado pelo Departamento de Pediatria FM/UFMG – parecer 02/2016 (Anexo B) e pelo COEP da UFMG – parecer 1.532.490 (Anexo C), em maio de 2016.




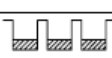
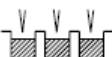


4.4 Metodologia

4.4.1 Teste de triagem neonatal para deficiência de biotinidase

4.4.1.1 Teste semiquantitativo da atividade da biotinidase em amostras de sangue seco em papel filtro

O teste de triagem neonatal foi realizado no Laboratório de Triagem Neonatal (LTN) do Nupad. As dosagens da atividade da biotinidase em amostras de sangue seco, em papel filtro, foram realizadas pelo método fluorimétrico semiquantitativo utilizando o *Neonatal Biotinidase Kit* – diagnóstico *in vitro*, 3018-0010 (Perkin Elmer). As amostras em papel filtro foram picotadas com 3,2 mm de diâmetro, em placa de 96 poços juntamente com os calibradores em duplicata e controles do *kit*. O exame foi realizado conforme o protocolo e instruções do fabricante. A figura 6 mostra as etapas do teste de forma resumida. Após finalizado o ensaio, a fluorescência gerada é medida no equipamento Victor (Perkin Elmer, Turku, Finlândia); o equipamento faz os cálculos e imprime os resultados da leitura automaticamente. Ao término, transferem-se os arquivos eletrônicos gerados para o servidor eletrônico para que estes possam ser exportados diretamente para o programa SISNEO (Sistema Nacional de Triagem Neonatal).

Figura 6 – Página de resumo do protocolo

| Neonatal Biotinidase kit 3018-0010 / 3018-001B Página de resumo do protocolo | | |
|---|---|---|
| PREPARAÇÃO DO REAGENTE | | |
| Reconstituir o Reagente de substrato de biotinidase |  | Adicionar 3 mL de Tampão de reconstituição de biotinidase ao frasco do Reagente do substrato de biotinidase. Dissolver, misturando por 30–60 minutos. |
| PROCEDIMENTO DE ENSAIO | | |
| Picotar os calibradores, controles e desconhecidos |  | Utilizar a microplaca negra incluída no kit. |
| Adicionar o Reagente de substrato de biotinidase |  | 25 µL |
| Incubar |  | 180 (± 10) min. a +50°C (± 2°C) coberta, sem agitar. |
| Adicionar etanol absoluto |  | 225 µL, agitar lentamente por 5 min. |
| Deixar a placa em repouso |  | 10 (10–60) min. no RT |
| Medir | Medir utilizando a excitação com comprimento de onda central de 355 nm e a emissão com comprimento de onda central de 460 nm. |  BTNDASE Com VICTOR™ D utilize a versão 1.12 revisão 2 ou superior. OBSERVAÇÃO: Alterar o algoritmo de ajuste para REGRESSION WEIGHT LINEAR no protocolo do MultiCalc (BTNDASE). |
| Cálculo de resultados | | Consulte a seção "CÁLCULO DOS RESULTADOS" |

Fonte: instruções de uso do *kit* Neonatal Biotinidase Kit (Perkin Elmer).

Os resultados são liberados via SISNEO, sendo considerados normais aqueles com valores acima de 60 nmol/min/dL.

4.4.1.2 Teste quantitativo em soro

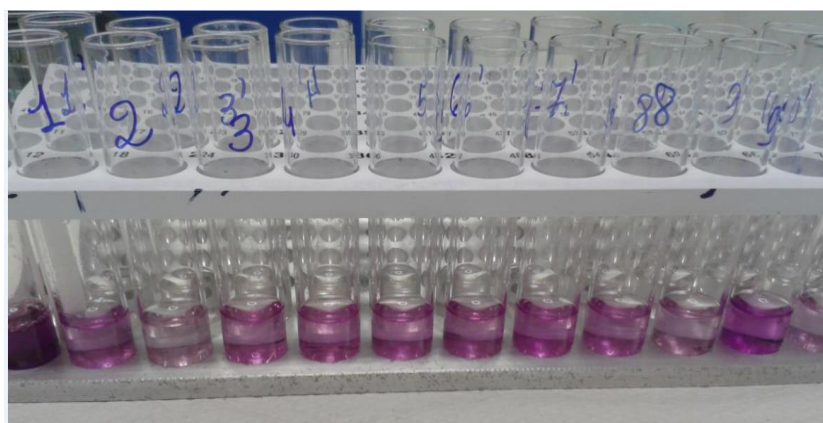
Os testes confirmatórios em amostras de soro foram também realizados no LTN seguindo-se o método colorimétrico estabelecido por Cowan, Blitzer e Wolf (2010). O protocolo técnico foi cedido pelo Laboratório de Genética e Bioquímica da Universidade de Stanford na Califórnia/EUA, por meio de parceria estabelecida entre as duas instituições.

As amostras de sangue total, cerca de 3 mL, foram colhidas no Posto de Coleta do Nupad e encaminhadas imediatamente para o LTN. Após 29 de setembro de 2016, as amostras passaram a ser transportadas em caixa de isopor contendo gelo gel, de forma a se manter a atividade enzimática mais estável. Assim que recebidas no LTN, as amostras foram imediatamente centrifugadas e o soro separado e congelado em freezer a -20°C , sendo descongelado apenas no momento do processamento do exame.

Para cada série de amostras foram testadas as amostras dos pacientes, um reagente branco para cada amostra de paciente (onde não é adicionado o substrato *biotin*), controles positivos, ácido p-aminobenzoico (PABA) e controles negativos (soro previamente desnaturado para garantir ausência de atividade da biotinidase).

A biotinidase presente no soro do paciente, quando incubada com o substrato artificial ácido 4-biotin-amidobenzoico (*biotin*), atua na liberação do PABA. O PABA liberado é diazotado com nitrito de sódio e o excesso de nitrito é removido com a adição do sulfamato de amônio. O PABA diazotado então reage com o N-(1-naftil)-etilenodiamina-diidroclorato, formando um produto final que é mensurado em espectrofotômetro a 546 nm. A intensidade da coloração final é diretamente proporcional à quantidade de PABA liberado que, por sua vez, é diretamente proporcional à atividade da biotinidase no paciente (figura 7).

Figura 7 – Teste quantitativo da atividade enzimática no soro



Fonte: Arquivo do Laboratório de Triagem Neonatal do Nupad

Finalizado o procedimento técnico, foram realizadas as leituras das absorvâncias de cada amostra, seu respectivo “branco” e dos controles, no espectrofotômetro UV/VIS SP1105 (Bel Photonics). Os resultados foram impressos e, posteriormente, calculada a atividade enzimática em planilha Excel®; ver exemplo na tabela 1.

Tabela 1: Exemplo dos cálculos da atividade de biotinidase no programa Excel®.

| Exame quantitativo da atividade de Biotinidase | | | | | |
|--|-------|----------------------------|---------------------------|---------|---------------------------------------|
| Código | Nome | Absorbância da amostra (A) | Absorbância do Branco (B) | (A - B) | Atividade da enzima (nmol/min/mL) |
| ABC/0001 | Ana | 0,080 | 0,046 | 0,034 | 0,3 (0,034*9,52 ^a) |
| ABC/0002 | Maria | 0,562 | 0,056 | 0,506 | 4,8 (0,506*9,52 ^a) |
| ABC/0003 | João | 0,529 | 0,051 | 0,478 | 4,6 (0,478*9,52 ^a) |
| ABC/0004 | José | 0,762 | 0,032 | 0,730 | 6,9 (0,730*9,52 ^a) |

^a 9,52 é o fator de calibração calculado com base no coeficiente molar do ácido para-aminobenzoico, no comprimento de onda de 546 nm, no fator de diluição da amostra e no tempo de incubação.

Fonte: Laboratório de Triagem Neonatal do Nupad

As faixas de referência para interpretação dos resultados foram estabelecidas pela equipe técnica do Nupad mediante teste de dosagem enzimática realizado com 200 amostras aleatórias. A partir do valor da atividade média normal da enzima (7,25 nmol/min/mL, considerada como 100%), foram estabelecidas as faixas de zero a 10% da atividade da biotinidase para DB profunda e de 11 a 30% da atividade da biotinidase para DB parcial. As faixas de referência são resumidas na tabela 2.

Tabela 2 – Referência para interpretação dos resultados da dosagem quantitativa da atividade da biotinidase - método colorimétrico (nmols/minuto/mL).

| Referência | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| 5,2 – 9,5 (nmols/minuto/mL) | Normal |
| 2,2 – 5,1 (nmols/minuto/mL) | Sugestivo de Heterozigoto |
| 0,8 – 2,1 (nmols/minuto/mL) | Sugestivo de Deficiência Parcial |
| < 0,8 (nmols/minuto/mL) | Sugestivo de Deficiência Profunda |

Fonte: Laboratório de Triagem Neonatal do Nupad

Os resultados foram inseridos manualmente e liberados via SISNEO. Uma via do resultado foi encaminhada ao LGBM para que fosse realizado o sequenciamento nucleotídico nos casos alterados (deficiência parcial, profunda ou *borderline*). Os resultados são sempre disponibilizados no site do Nupad para a equipe responsável pelo atendimento das crianças no ambulatório e, também, para os pais ou responsáveis.

4.4.2 Testes moleculares para deficiência de biotinidase

4.4.2.1 Sequenciamento nucleotídico para o gene *BTB*

O DNA foi extraído a partir das amostras de sangue colhidas em tubos com EDTA ou diretamente em papel filtro FTA. Ambas as opções foram validadas para o sequenciamento do gene *BTB* pela equipe técnica do LGBM. Posteriormente, no decorrer do estudo foi validado o sequenciamento a partir do DNA extraído de amostras de papel-filtro usado na triagem. Para extração do DNA, foi utilizado o reagente *Chelex 100* (BioRad), conforme protocolo descrito no Anexo B, adaptado de Walsh, Metzger e Higuchi (1991).

O DNA das amostras foi amplificado por PCR específica para os éxons 1, 2, 3 e 4, e regiões promotoras e intrônicas flangeadoras dos éxons do gene *BTB*. Foram realizadas seis reações distintas de PCR para cada paciente, sendo uma reação para cada éxon, com exceção do éxon 4 que foi dividido em três fragmentos parcialmente superpostos, denominados 4.1, 4.2 e 4.3.

As reações de PCR foram padronizadas pela doutoranda juntamente com a equipe técnica do LGBM. Os iniciadores utilizados para os éxons 1 e 4 (THODI *et al.*, 2013), e para os éxons 2 e 3 (POMPONIO *et al.*, 1997) estão especificados na tabela 3.

Tabela 3 – Conjunto de iniciadores utilizados para sequenciamento do gene *BTB*

| Região | Código dos iniciadores | Sequência 5'– 3' | Fragmento amplificado | Temp. de anelamento |
|-----------------|------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------|
| Exon 1 | PG-58 (F) | ATTCGCGCGCCAGAATGCCA | 242 pb | 56°C |
| | PG-59 (R) | GGACCGCACGCCCTTACCAC | | |
| Exon 2 | PG-60 (F) | GCAGGATTCTTTATTCAGCTG | 362 pb | 56°C |
| | PG-61 (R) | GCAATCTGCTCTGTATGAGAG | | |
| Exon 3 | PG-62 (F) | CCTGCCATCTGATAACAGAC | 255 pb | 56°C |
| | PG-63 (R) | CTGACTTAGATCACCTCTGTG | | |
| Exon 4.1 | PG-64 (F) | TGCTGGGATTACAGGCAAAAACCTCA | 513 pb | 60°C |
| | PG-65 (R) | CCCCAGAACTGGGTGGTGGACA | | |
| Exon 4.2 | PG-66 (F) | TCCTCAGAGACTACAAGGTGAAGCA | 566 pb | 60°C |
| | PG-67 (R) | CCCATCAAAGACCCCCAGGGC | | |
| Exon 4.3 | PG-68 (F) | CCCTGGTCCCTGTCTGGGGAA | 458 pb | 60°C |
| | PG-69 (R) | TGATGGCCAGAGTCCGCCCC | | |

(F) Forward, (R) Reverso

O *mix* de reação foi preparado na seguinte proporção:

| | |
|--|---------|
| Tampão 5X <i>Colorless GoTaq</i> (pH 8.5, MgCl ₂ 7,5mM) | 10 µL |
| dNTPs [200 µM] | 1 µL |
| Iniciador F [10 pmol/µL] | 2,5 µL |
| Iniciador R [10 pmol/µL] | 2,5 µL |
| H ₂ O ultrapura | 26,0 µL |
| Total | 42 µL |

O *mix* da enzima foi preparado, separadamente, conforme abaixo:

| | |
|--|---------|
| <i>GoTaq</i> DNA polimerase (5u/µL) | 0,25 µL |
| Tampão 5X <i>Colorless GoTaq</i> (pH 8.5, MgCl ₂ 7,5mM) | 0,30 µL |
| Água ultrapura | 2,45 µL |
| Total | 3,0 µL |

A cada tubo contendo os 42 µL do *mix*, foram adicionados 5 µL do DNA extraído. Os tubos foram colocados no termociclador modelo Veriti (Applied Biosystems) e iniciado o programa de ciclagem; passados 4 minutos, o programa foi pausado e foram adicionados 3,0 µL do *mix* da enzima em cada tubo, totalizando volume final de 50 µL.

O programa de ciclagem utilizado para os éxons 1, 2 e 3 foi 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 2 min, extensão a 72°C por 10 min e, por último, 4°C por tempo infinito.

O programa de ciclagem para os fragmentos do éxon 4 foi 95°C por 5 min seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 2 min, extensão a 72°C por 10 min e, por último, 4°C por tempo infinito.

O produto da PCR foi purificado seguindo-se o protocolo de precipitação por purificação alcoólica com pequenas modificações (APPLIED BIOSYSTEMS, 2000), conforme descrito abaixo:

- A cada tubo contendo os 50 µL de produto da PCR, foram adicionados 200 µL de isopropanol a 70%, homogeneizou-se em vórtex e manteve-se à temperatura ambiente por 15 minutos;
- Centrifugou-se por 30 minutos a 14.000 rpm, para formação do precipitado;
- Descartou-se o sobrenadante;
- Adicionaram-se 100 µL de etanol 70% a cada tubo, agitou-se em multivórtex por 1 minuto e centrifugou-se por 15 minutos a 14.000 rpm;

- Descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se mais 100 μ L de etanol 70% a cada tubo, agitou-se em multivórtex por 1 minuto e centrifugou-se novamente por 15 minutos a 14.000 rpm;
- Descartou-se todo o sobrenadante e adicionaram-se 50 μ L de água ultrapura.

Após a purificação, o DNA amplificado e purificado foi submetido à quantificação em gel de agarose a 2%, tratado com corante intercalante *SyberSafe* (Invitrogen), no qual foram aplicados 5 μ L do DNA purificado juntamente com 5 μ L de corante azul de bromofenol (Sigma) e padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen), que é utilizado como parâmetro para a quantificação do DNA baseada na intensidade de banda visualizada no gel.

O resultado foi visualizado sob transiluminador de luz ultravioleta (UV) e analisado a partir da comparação visual da intensidade dos fragmentos de DNA obtidos com a intensidade dos fragmentos do padrão de peso molecular. Todos os géis foram fotografados utilizando-se o sistema de captura de imagem digital (LPIX – Loccus Biotecnologia), gravados eletronicamente e impressos para arquivo.

A reação de sequenciamento foi realizada usando-se o *kit BigDye Terminator* (Applied Biosystems), versão 3.1 e 5 pmol/ μ L de cada iniciador, segundo instruções do fabricante.

Os iniciadores utilizados para sequenciamento (ver Tabela 3) foram PG-59 para o éxon 1, PG-61 para o éxon 2, PG-63 para o éxon 3, PG-64, PG-66 e PG68 para o éxon 4, fragmentos 4.1, 4.2 e 4.3, respectivamente. O programa de ciclagem utilizado foi 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg e 60°C por 4 min, seguidos da temperatura final de 4°C por tempo infinito.

Em caso de dúvida na identificação das mutações, foram utilizados os outros iniciadores PG-58, PG-60 e PG-62 para os éxons 1, 2 e 3 respectivamente; para o éxon 4, os iniciadores PG-65, PG-67 e PG-69. Quando foi necessário confirmar a presença de mutações localizadas mais ao final do éxon 4, na direção 3', foram utilizados os iniciadores: PG-70 (FW) 5'-ACCTGTGGGGCAACTTCAGT-3' e PG-71 (RV) 5'-ATGGTCCCAGGGCTTG TAGC-3' para amplificação do fragmento de 302 pb e PG-71 para sequenciamento (MÜHL *et al.*, 2001).

Após a reação de sequenciamento, foi realizada nova precipitação por purificação alcoólica, segundo o protocolo abaixo:

- A cada tubo contendo o produto de PCR, adicionaram-se 80 μ L de isopropanol a 70%, homogeneizou-se em vórtex e manteve-se à temperatura ambiente por 20 minutos;
- Centrifugou-se por 25 minutos a 13.000 rpm;
- Descartou-se o sobrenadante;
- Adicionaram-se 250 μ L de etanol 70% a cada tubo, agitou-se em multivórtex por 2 minutos e centrifugou-se por 5 minutos a 13.000 rpm;

- Descartou-se o sobrenadante; colocaram-se os tubos em banho seco a 95°C por 1 minuto com a tampa aberta, para secar;
- Os tubos foram armazenados secos a -20°C até o momento de uso.

Após a adição de 12 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) a cada tubo, o volume total foi aplicado em placa *96-wells* e colocado no sequenciador automático (Applied Biosystems, modelo ABI Prism 3130XL Genetic Analyser).

As sequências obtidas foram analisadas por meio do software *sequencing analysis* (versão 5.3.1). As sequências foram, então, alinhadas com a sequência de referência NG_008019.1 (NCBI) por meio do programa de alinhamento *Bioedit* (HALL, 1999), versão 7.2.5, para identificação das variantes. Todos os dados foram gravados eletronicamente.

Foi realizada análise *in silico* das variantes alélicas identificadas como “novas” (ainda não registradas na literatura), para classificar o potencial impacto na estrutura ou função da proteína. Foram utilizados os softwares PolyPhen-2 (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013), Mutation Taste (SCHWARZ *et al.*, 2014), SIFT (KUMAR; HENIKOFF; NG, 2009), e PROVEAN (CHOI; CHAN, 2015).

4.4.2.2 Detecção da variante p.D444H por PCR alelo-específica

A variante p.D444H foi detectada por meio de PCR alelo-específica, a partir do DNA extraído das amostras de sangue seco em papel filtro. Os iniciadores utilizados estão assinalados na Tabela 4.

Tabela 4– Iniciadores utilizados para detecção da p.D444H

| | Código dos iniciadores | Sequência 5'– 3' | Referência |
|--------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------|
| D444H | PG-68 (NF) | CCCTGGTCCCTGTCTGGGGAA | Thodi (2013) |
| | PG-72 (R) | ATGTACTGTGTGAAGCCCATC | Este estudo |
| | PG-73 (MF) | ATGTACTGTGTGAAGCCCATG | Este estudo |

(NF) Normal *Foward*, (R) Reverso, (MF) Mutado *Foward*

As condições de PCR foram as seguintes:

| | |
|--|--------|
| Tampão 5X <i>Colorless GoTaq</i> (pH 8.5, MgCl ₂ 7,5mM) | 5,0 µL |
| dNTPs [200 µM] | 0,5 µL |
| Iniciador F [10 pmol/µL] | 0,5 µL |
| Iniciador R [10 pmol/µL] | 0,5 µL |

| | |
|----------------------------|---------|
| H ₂ O ultrapura | 14,5 µL |
| Total | 21,0 µL |

O mix da enzima foi preparado, separadamente, na seguinte proporção:

| | |
|--|---------|
| <i>GoTaq</i> DNA polimerase (5u/µL) | 0,15 µL |
| Tampão 5X <i>Colorless GoTaq</i> (pH 8.5, MgCl ₂ 7,5mM) | 0,30 µL |
| Água ultrapura | 2,55 µL |
| Total | 3,0 µL |

A cada tubo contendo os 21,0 µL de *mix* foi adicionado 1,0 µL do DNA extraído. Os tubos foram colocados no termociclador modelo Veriti (Applied Biosystems) e iniciado o programa de ciclagem. Passados 1 min e 45 seg, o programa foi pausado e foram adicionados 3 µL do *mix* da enzima em cada tubo, totalizando volume final de 25 µL.

O programa de ciclagem utilizado foi 95°C por 2 min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 2 min, 60°C por 1 min e 72°C por 2 min, extensão a 72°C por 10 min e, por último, 4°C por tempo infinito.

Em cada sessão de PCR, juntamente com o DNA das amostras, foi acrescentado um controle positivo (DNA heterozigoto para p.D444H) para garantir que teria havido amplificação de DNA, e um controle negativo (DNA negativo para p.D444H), para garantir que não teria havido contaminação durante o procedimento. O tamanho do fragmento gerado é de 139 pb.

Em seguida, os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese capilar utilizando *QIAxcel DNA Screening kit* no instrumento QIAxcel Advanced (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante. Após a corrida, as imagens geradas foram analisadas, impressas para arquivo e salvas eletronicamente.

4.5 Análise dos dados

Todos os dados obtidos durante o estudo foram organizados e analisados em planilhas do Microsoft® Office Excel. Foram determinadas as frequências de DB profunda e parcial, as frequências das diversas variantes e realizada a correlação entre o fenótipo bioquímico e o genótipo na população estudada.

4.6 Referências bibliográficas

1. Applied Biosystems. Automated DNA sequencing – Chemistry guide, cap.3, p.37-38, 2000.
2. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013; Chapter 7:Unit7.20
3. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics.* 2015; 31(16):2745-7
4. Cowan TM, Blitzer MG, Wolf B; Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency. *Genet Med.* 2010; 12(7):464-70.
5. Hall, TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999; 41:95-98.
6. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009; 4(7):1073-81.
7. Mühl A, Möslinger D, Item CB, Stöckler-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.
8. Pomponio RJ, Hymes J, Reynolds TR, Meyers GA, Fleischhauer K, Buck GA, et al. Mutations in the human biotinidase gene that cause profound biotinidase deficiency in symptomatic children: molecular, biochemical, and clinical analysis. *Pediatr Res.* 1997; 42(6):840-8.
9. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014; 11(4):361-2.
10. Thodi G, Molou E, Georgiou V, Loukas YL, Dotsikas Y, Biti S, et al. Mutational analysis for biotinidase deficiency of a Greek patients' cohort ascertained through expanded newborn screening. *J Hum Genet.* 2011; 56(12):861-5
11. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991; 10(4):506-13.

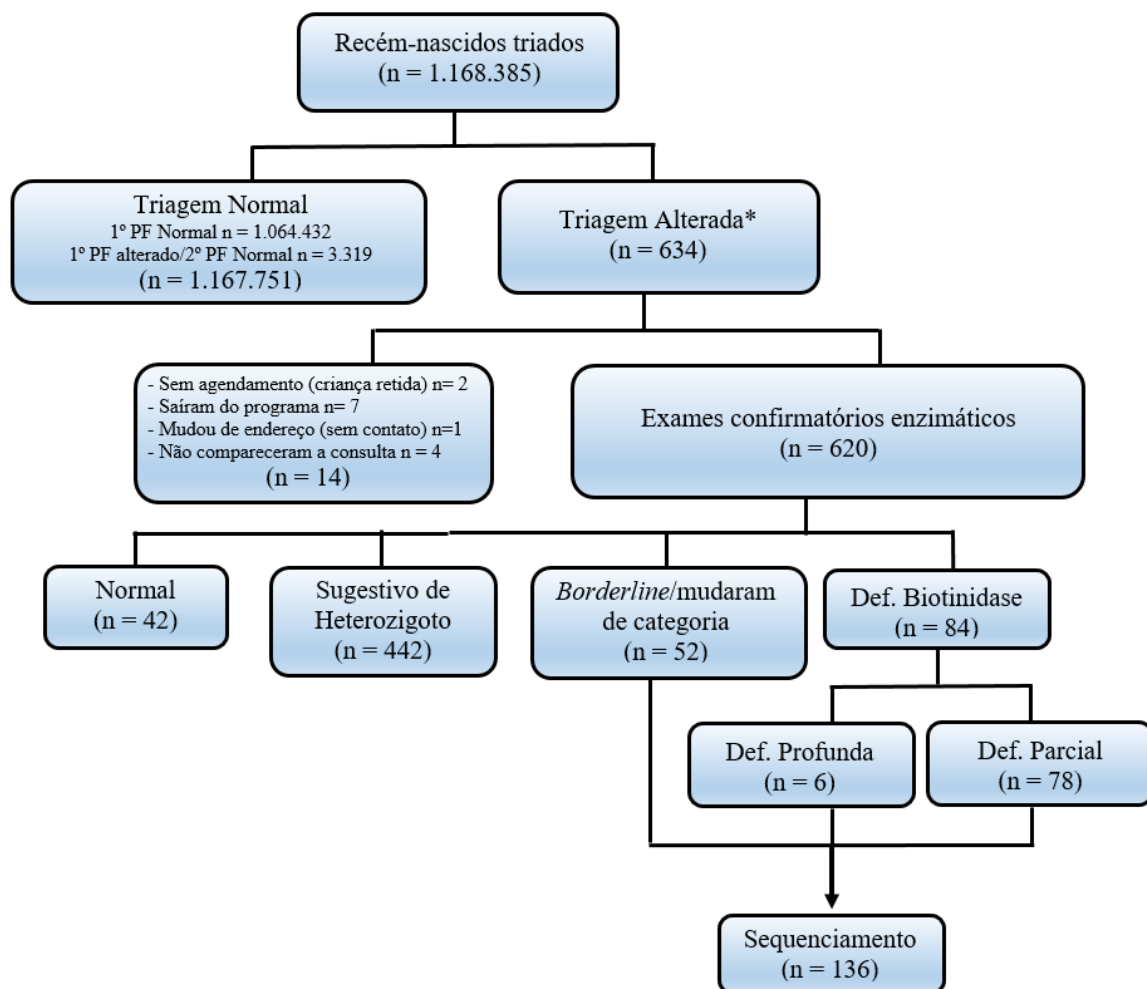
5 Resultados

5.1 Fluxograma da casuística

Durante o período de 01 de junho de 2013 a 31 de maio de 2018 (5 anos completos) foram triados 1.168.385 recém-nascidos para deficiência de biotinidase. Destes, 634 (0,05%) tiveram resultados alterados para o teste fluorimétrico semiquantitativo em amostras de sangue seco em papel filtro. O fluxograma da conduta adotada para esses 634 casos está representado na figura 8.

Conforme apresentado no fluxograma, do total de recém-nascidos com triagem alterada, 620/634 (97,8%) compareceram à consulta médica e realizaram exames confirmatórios de dosagem da biotinidase em amostra de soro. Foram identificados 84 RN com deficiência de biotinidase, isso é, com atividade enzimática de até 30% da atividade de referência para o laboratório e 52 casos *borderline* ou que mudaram de categoria, por exames enzimáticos subsequentes. Esses pacientes foram classificados, portanto, em quatro categorias, de acordo com o resultado da dosagem da atividade enzimática no soro: deficiência profunda, deficiência parcial, *borderline* e casos que mudaram de categoria ao longo do estudo. No Anexo E disponibiliza-se a tabela com os resultados dos testes bioquímicos e moleculares dos 136 pacientes.

Figura 8 – Fluxograma da casuística



* Casos encaminhados para consulta médica:



- Primeira e segunda amostras com resultado da dosagem enzimática da biotinidase em papel filtro com valores inferiores a 60 nmols/min/dL (583 casos)
- Protocolo maternidade: primeira amostra com valor superior a 60 nmols/min/dL, sendo a segunda ou mais amostras com valores inferiores a 60 nmols/min/dL (23 casos)
- Primeira amostra inadequada e 2ª amostra com valor inferior a 60 nmols/min/dL (26 casos)
- Primeira e segunda amostras inadequadas (2 casos)

5.2 Artigo 1: Frequency of biotinidase gene variants and incidence of biotinidase deficiency in the Newborn Screening Program in Minas Gerais, Brazil (artigo publicado).

Original Article

Frequency of biotinidase gene variants and incidence of biotinidase deficiency in the Newborn Screening Program in Minas Gerais, Brazil

J Med Screen
0(0) 1–6
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/0969141319892298
journals.sagepub.com/home/jmsc
SAGE

Nara de Oliveira Carvalho¹ , José Nélio Januário²,
Gilsimary Lessa Pereira Felix¹, Daniela Magalhães Nolasco¹,
Roberto Vagner Puglia Ladeira¹, Dora Mendes del Castillo¹,
Ana Lúcia Pimenta Starling³, Rocksane de Carvalho Norton³ and
Marcos Borato Viana³ 

Abstract

Objective: The prevalence of biotinidase deficiency and the frequency of biotinidase gene variants in Brazil are not documented. We aimed to determine the incidence of partial and profound biotinidase deficiency in the state of Minas Gerais, Brazil, and to calculate the frequency of biotinidase gene variants in the newborn screening program of Minas Gerais.

Methods: Neonates (1,168,385) were screened from May 2013 to June 2018. Those detected with abnormal biotinidase activity based on semi-quantitative assays underwent confirmatory serum tests. The biotinidase gene was sequenced in all confirmed cases.

Results: The combined incidence of partial and profound biotinidase deficiency was estimated at 1:13,909 live births (95% confidence limit 1:11,235–1:17,217), much higher than the incidence rates reported in other populations worldwide. The most frequent biotinidase gene variants were p.D444H (allele frequency, 0.016), haplotype c.1330G>C;c.511G>A (p.D444H; A171T), p.D543E, c.310-15delT (intronic), p.V199M, and p.H485Q. Together these accounted for 74.6% of the alleles analysed.

Conclusion: Newborn screening for biotinidase deficiency, which revealed a higher incidence in Minas Gerais, is feasible and plays a critical role in the early identification of affected neonates and prevention of symptoms and irreversible sequelae. Biotinidase gene sequencing is a useful tool to confirm the diagnosis, and also provides valuable information about genetic variability among different populations.

Keywords

Biotinidase, biotinidase deficiency, newborn screening, biotinidase gene, mutation

Date received: 24 August 2019; accepted: 13 November 2019

Introduction

Biotinidase deficiency (BD, OMIN#253260) is an autosomal recessive metabolic disorder caused by mutations in the biotinidase gene (*BTD*). This gene codes for biotinidase enzyme (BTD, EC 3.5.1.12), which plays a major role in biotin metabolism.^{1–3} Determination of BTD activity helps to identify individuals with profound BD (up to 10% of mean normal activity), and those with partial BD (10% to 30% of mean normal activity).⁴ BD clinical features are highly variable, including neurological and cutaneous symptoms.⁵ Administration of free biotin at pharmacological doses (usually 10 mg daily) throughout life is a simple, inexpensive, and highly effective form of

¹NUPAD – Center for Newborn Screening and Genetic Diagnostics, UFMG – Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Department of Medicine, NUPAD – Center for Newborn Screening and Genetic Diagnostics, UFMG – Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³Department of Pediatrics, NUPAD – Center for Newborn Screening and Genetic Diagnostics, UFMG – Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Corresponding author:

Nara de Oliveira Carvalho, Av. Alfredo Balena 190, 5º andar, NUPAD, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, Brazil.

Email: nara@nupad.medicina.ufmg.br

treatment, that prevents the onset of symptoms when initiated in the first months of life.⁶ BD was first included in a newborn screening program in 1984 in the United States, based on a colorimetric method used for semi-quantitative determination of BTD activity in dry blood samples on filter paper,⁶ and several countries now include BD in their newborn screening programs.⁷

Since 1993, the Newborn Screening Program of Minas Gerais has screened an average of 240,000 babies annually. A pilot study for BD screening conducted in 2007–2008 revealed that the combined incidence of partial and profound forms of BD in 182,891 babies was higher than that in several other parts of the world.⁸ Based on these results, BD was officially included in the newborn screening program disease panel in 2013.

Diagnosis of neonatal BD by biochemical techniques can be challenging, as the enzymatic activity is influenced by external factors like improper handling of specimens, improper drying, delayed submission, or exposure to excess heat.^{9–11} In this context, *BTD* sequencing can be a useful tool to determine BD status, to support therapeutic decisions of supplementing biotin in these patients.^{11–13} Additionally, borderline biochemical results can be better evaluated if the underlying *BTD* mutations are known. More than 200 *BTD* variants have been described (see http://www.arup.utah.edu/database/BTD/BTD_display.php, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, and <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). However, the accurate frequencies of these variants in Brazil have not been reported.^{8,12,14,15}

This study aimed to determine the incidence of BD in Minas Gerais, as well as the frequency of *BTD* variants in babies diagnosed with partial or profound deficiency, including that of the most common variant, p.D444H (c.1330G>C),^{7,9} in the newborn population of Minas Gerais.

Methods

From June 2013 to May 2018, the Newborn Screening Program of Minas Gerais screened 1,168,385 newborns for BD. The biochemical and molecular tests were performed in the laboratories of the Center for Newborn Screening and Genetic Diagnostics (Nupad) of the Federal University of Minas Gerais, Brazil. The BD screening test was performed on dried blood samples on filter paper, collected between days 3 and 5 of life, using Neonatal Biotinidase Kit (Perkin Elmer, Wallac Oy, Turku, Finland) per the manufacturer's instructions. Babies were screened twice, and the results were considered abnormal if both tests on samples collected on filter paper at different times yielded values <60 nmols/min/dL. Additionally, results were considered abnormal when neonates provided inadequate samples for the first test and the second test yielded values <60 nmols/min/dL, when babies provided inadequate samples for both tests, or when the first test for preterm or in-hospital neonates yielded values

>60 nmols/min/dL, but the second test yielded values <60 nmols/min/dL.

The families of babies with results considered abnormal were scheduled for clinical consultation, and serum samples were collected from the babies and, when possible, from their respective parents. Serum BTD quantitative assay was performed according to the protocol published by the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee.⁹ For the calculation of the relative BTD activity in the serum, the average of the reference range of values for BTD activity in Nupad lab, 7.25 nmol/min/mL, was used as 100%. Hence, the reference values for interpretation of the results were: (i) normal BTD activity, 5.2–9.5 nmol/min/mL, (ii) BTD activity suggestive of heterozygosis, 2.2–5.1 nmol/min/mL, (iii) BTD activity suggestive of partial deficiency, 0.8–2.1 nmol/min/mL, and (iv) BTD activity suggestive of profound deficiency, <0.8 nmol/min/mL. Values of 2.2 and 2.3 nmol/min/mL were considered as borderline results. For patients with more than one determination, the highest value was used for classification.

All infants diagnosed with profound or partial BD were given oral supplementation with 10mg biotin daily, and have been followed up in a specialized outpatient clinic. Exons 1–4 of *BTD* as well as their flanking regions were sequenced, as described previously,⁸ for all cases that were classified as profound or partial BD, or for those with borderline values, as well as for babies whose biochemical categorization changed along the course of our study. Allele-specific polymerase chain reaction for the variant p.D444H (c.1330G>C; rs13078881) was performed with DNA extracted from the dried blood samples on filter paper for 601/634 neonates (94.8%) for whom the fluorimetric test results were abnormal. Specific primers were designed for this study and are available on request. The amplified fragments were subjected to capillary electrophoresis using Qiaxcel DNA Screening Kit and QIAxcel Advanced Instrument (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais, Brazil, approval # 1,532,490. Written informed consent was obtained from either the parents or guardians of the infants.

Results

For 634 out of 1,168,385 babies screened, the results for BD were abnormal. Families of these babies were invited to confirm the abnormal results with quantitative serum BTD activity determination. Of the 634 families, 620 (97.7%) attended a medical appointment and had serum samples collected. For 416 infants (67.1%), the serum BTD activity was also determined in both the parents; in 110 babies (17.7%), blood was drawn only from the mothers. In the remaining 94 families (15.2%), only samples from babies could be collected. We diagnosed a mother

and a father from two distinct families with partial BD. Both were followed at the outpatient clinic, but both were asymptomatic during the course of this study.

Among the 620 newborns, 42 (6.8%) had BTD activity in the normal range (5.2–9.5 nmol/min/mL) and 442 (71.3%) had values in the range suggestive of heterozygosis (2.2–5.1 nmol/min/mL). In the remaining 136 (21.9%), the *BTD* gene was sequenced: 84 were classified as having BD (six with profound BD and 78 with partial BD), 6 presented borderline values, and 46 presented values indicating partial BD or suggestive of heterozygosis, as previously defined. All 136 children were followed up at the specialized outpatient clinic. During the study period, BTD activity was measured (1–6 times) at different times in these 136 children, and in 131 of them, the test was carried out at least twice.

Based on these data, the combined incidence of partial and profound BD was estimated as 1:13,909 live births (1:11,235 to 1:17,217, 95% confidence limit). The incidence

of profound BD was 1:194,731 (1:89,286 to 1:424,809, 95% confidence limit) and that of partial BD, 1:14,979 (1:12,003 to 1:18,692, 95% confidence limit).

After sequencing *BTD*, 36 different mutations were identified, including 9 novel variants, and 27 of that have been previously reported (Table 1). There were 28 missense mutations, 5 base deletions, and 1 nonsense and 2 silent mutations; the majority of these were located in exon 4. In relation to the *BTD* variants identified in these 136 newborns, 264 alleles were included in the calculation of frequency (Table 2). Eight alleles were excluded because they were found in siblings. Parental *BTD* sequencing was done for only 16 children. In addition to the well-known haplotype c.1330G>C;c.511G>A (p.D444H;A171T), other inherited *cis*-mutations identified included one case of c.310-15delT;c.632G>T (intronic;p.R211L), one case of c.1330G>C;c.470G>A (p.D444H;R157H) and seven cases of c.595G>A; c.1413T>C (p.V199M;C471C). The *cis* configuration was confirmed by gene sequencing of the

Table 1. Variants identified in newborn screening patients in Minas Gerais, Brazil.

| Effect | Nucleotide change | Location | Mutation type | Mutation reference |
|-----------------|--------------------|----------|---------------|-------------------------------|
| mRNA expression | c.310-15del T | Intron 2 | Intronic | Li (2014) ¹⁶ |
| p.C33Ffs*36 | c.98_104d713 | Exon 2 | Deletion | Pomponio (1997) ¹⁷ |
| p.L40P | c.119T>C | Exon 2 | Missense | Borsatto (2014) ¹⁴ |
| p.Q88Rfs*10 | c.263 delA | Exon 2 | Deletion | Carvalho (2019) ¹⁸ |
| p.L90R | c.269T>G | Exon 2 | Missense | Carvalho (2019) ¹⁸ |
| p.Y93C | c.278A>G | Exon 2 | Missense | Wolf (2002) ¹⁹ |
| p.G114V | c.341G>T | Exon 3 | Missense | Wolf (2005) ²⁰ |
| p.R122G | c.364A>G | Exon 3 | Missense | Norrgard (1999) ²¹ |
| p.R157H | c.470G>A | Exon 4 | Missense | Pomponio (1997) ¹⁷ |
| p.A171T | c.511G>A | Exon 4 | Missense | Norrgard (1999) ²¹ |
| p.V199M | c.595G>A | Exon 4 | Missense | Wolf (2002) ¹⁹ |
| p.R211S | c.631C>A | Exon 4 | Missense | Carvalho (2019) ¹⁸ |
| p.R211L | c.632G>T | Exon 4 | Missense | Carvalho (2019) ¹⁸ |
| p.A237T | c.709G>A | Exon 4 | Missense | Procter (2016) ¹³ |
| p.D252G | c.755A>G | Exon 4 | Missense | Norrgard (1999) ²¹ |
| p.L278I | c.832C>A | Exon 4 | Missense | Carvalho (2019) ¹⁸ |
| p.A281V | c.842C>T | Exon 4 | Missense | Lara (2015) ⁸ |
| p.K286Kfs*22 | c.858 delA | Exon 4 | Deletion | Carvalho (2019) ¹⁸ |
| p.I294V | c.880A>G | Exon 4 | Missense | Procter (2016) ¹³ |
| p.S311T | c.932G>C | Exon 4 | Missense | Carvalho (2019) ¹⁸ |
| p.F361V | c.1081T>G | Exon 4 | Missense | Carvalho (2019) ¹⁸ |
| p.VV409Cfs*91 | c.1227_1241del 511 | Exon 4 | Deletion | Norrgard (1999) ²¹ |
| p.Y428Y | c.1284C>T | Exon 4 | Silent | Wolf (2005) ²⁰ |
| p.Y438X | c.1314T>A | Exon 4 | Nonsense | Neto (2004) ¹⁵ |
| p.D444H | c.1330G>C | Exon 4 | Missense | Swango (1998) ²² |
| p.Q456H | c.1368A>C | Exon 4 | Missense | Norrgard (1999) ²¹ |
| p.V457A | c.1370T>C | Exon 4 | Missense | dbSNP (rs149690919) |
| p.C471C | c.1413T>C | Exon 4 | Silent | Hymes (2001) ²³ |
| p.H485Q | c.1455C>G | Exon 4 | Missense | Procter (2016) ¹³ |
| p.Y494C | c.1481A>G | Exon 4 | Missense | Procter (2016) ¹³ |
| p.P497S | c.1489C>T | Exon 4 | Missense | Norrgard (1999) ²¹ |
| p.T532M | c.1595C>T | Exon 4 | Missense | Norrgard (1999) ²¹ |
| p.A534V | c.1601C>T | Exon 4 | Missense | Carvalho (2019) ¹⁸ |
| p.R538C | c.1612C>T | Exon 4 | Missense | Pomponio (1997) ¹⁷ |
| p.R538H | c.1613G>A | Exon 4 | Missense | Procter (2016) ¹³ |
| p.D543E | c.1629C>A | Exon 4 | Missense | Procter (2016) ¹³ |

Novel variants are those cited in the reference Carvalho (2019)¹⁸.

Table 2. Frequency of BTB variants identified in newborn screening from Minas Gerais, Brazil, during the 5-year study.

| Nucleotide change | Effect | No. alleles ^a | (%) |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------|
| c.1330G>C | p.D444H | 136 ^b | 51.5 |
| c.1330G>C/c.511G>A | p.D444H/A171T | 21 | 8.0 |
| c.1629C>A | p.D543E | 16 | 6.1 |
| c.310-15delIT | mRNA expression | 8 | 3.0 |
| c.595G>A/c.1413T>C | p.V199M/p.C471C | 8 | 3.0 |
| c.1455C>G | p.H485Q | 8 | 3.0 |
| c.98_104d7i3 | p.C33Ffs*36 | 7 | 2.7 |
| c.1081T>G | p.F361V | 7 | 2.7 |
| c.341G>T | p.G114V | 6 | 2.3 |
| c.1368A>C | p.Q456H | 6 | 2.3 |
| c.1489C>T/c.1284C>T | p.P497S/p.Y428Y | 4 | 1.5 |
| c.1314T>A | p.Y438X | 4 | 1.5 |
| c.1601C>T | p.A534V | 4 | 1.5 |
| Not detected | Normal | 4 | 1.5 |
| c.755A>G | p.D252G | 3 | 1.1 |
| c.119T>C | p.L40P | 2 | 0.8 |
| c.1595C>T | p.T532M | 2 | 0.8 |
| c.310-15delIT/c.632G>T | RNA expression /p.R211L | 1 | 0.4 |
| c.263 delA | p.Q88Rfs*10 | 1 | 0.4 |
| c.269T>G | p.L90R | 1 | 0.4 |
| c.278A>G | p.Y93C | 1 | 0.4 |
| c.364A>G | p.R122G | 1 | 0.4 |
| c.470G>A | p.R157H | 1 | 0.4 |
| c.1330G>C/c.470G>A | p.D444H/R157H | 1 | 0.4 |
| c.631C>A | p.R211S | 1 | 0.4 |
| c.709G>A | p.A237T | 1 | 0.4 |
| c.832C>A | p.L278I | 1 | 0.4 |
| c.842C>T | p.A281V | 1 | 0.4 |
| c.858 delA | p.K286Kfs*22 | 1 | 0.4 |
| c.932G>C | p.S311T | 1 | 0.4 |
| c.1227_1241d15i11 | p.W409Cfs*91 | 1 | 0.4 |
| c.1370T>C | p.V457A | 1 | 0.4 |
| c.1481A>G | p.Y494C | 1 | 0.4 |
| c.1612C>T | p.R538C | 1 | 0.4 |
| c.1613G>A | p.R538H | 1 | 0.4 |
| Total | | 264 | 100.0 |

^aEight alleles from four related neonates (siblings) were excluded from the analysis.

^bThis number includes 23 children with homozygous c.1330G>C. Two had partial BTB deficiency in two distinct samples at 2 and 3 months of life, and 21 had serum BTB activity similar to heterozygous individuals for severe variants.

respective parents in all three haplotypes. In four cases of the well-known haplotype c.1489C>T; c.1284C>T (p.P497S;Y428Y), parental *BTB* was not sequenced. The silent variant c.1413T>C (p.C471C) was always detected together with c.595G>A (p.V199M), and never detected alone or in *cis* with any other variant. Notably, one child homozygous for this haplotype was identified.

Among the 136 newborns, only eight were identified in homozygous state (except for p.D444H): three with profound BD (variants p.G114V, p.A534V and haplotype c.1330G>C;c.511G>A (p.D444H;A171T), and five with

partial BD, two with p.F361V, two with p.D543E, and one with p.V199M. Clinical consanguinity was reported for only the last child, but genetic tests were not run in any of the couples.

Among the 634 newborns for whom the screening fluorimetric test detected abnormal values for BTB activity, allele-specific polymerase chain reaction for the detection of p.D444H (c.1330G>A) was performed on dried blood samples of 601 babies. We identified 296 newborns homozygous for the p.D444H allele, yielding a frequency of 0.000253 in the five-year period of this study (0.0253%). Based on the Hardy-Weinberg equilibrium, the estimated frequency of the mutant allele was 0.016 (1.6%), and that of the wild type allele was 0.984 (98.4%). The frequency of heterozygous individuals for p.D444H in the newborn population studied was 0.031 (3.1%).

The costs of running such a programme were US \$460,000 a year, including screening tests and serum BTB determination, given the number of newborns in Minas Gerais and the incidence of BD detected in the present study. Molecular studies in 21.5% of children who had BTB serum determination added US\$2,720 a year to the costs.

Discussion

From over one million newborns screened in the state of Minas Gerais in this study, 84 were diagnosed with BD. The estimated worldwide combined incidence of profound and partial BD is 1:60,089.²⁴ In the United States, the incidence of profound BD is 1:80,000, and partial BD between 1:31,000 and 1:40,000.¹¹ In Europe, a study including nine countries showed an incidence of combined BD of 1:47,486.²⁵ Few studies exist on the incidence of BD in Brazil. The first, in the state of Paraná, found two neonates with BD (one partial and one profound) among 125,000 babies screened during eight months.²⁶ This was close to the worldwide incidence,²⁴ but the sample size was about nine times smaller than that in the present study. A smaller study (20,529 neonates) in Maringá (Paraná) found a combined incidence of profound and partial BD of 1:6843,²⁷ but the diagnostic method was not clearly stated, and it is possible that only the semi-quantitative colorimetric test was used. In a study of 225,136 babies across several Brazilian states, the estimated combined BD incidence was 1:9000,¹⁵ but the authors reported difficulties in the transport and storage of serum samples owing to the large size of the country. As BTB is temperature-sensitive, the possibility of false-positives should be considered. In the present study, BD incidence was estimated at 1:13,909, even higher than that reported in our previous pilot study of 182,891 neonates (1:22,861).⁸ The strengths of our study are the population size, the methodologies used, and adherence to stringent recommended quality control processes.^{9,11} It is possible that BD incidence in Brazil may be among the highest in the world, and only

lower than in countries with high consanguinity rates, such as Turkey, where the combined BD incidence is 1:7116.²⁸

In our study, 36 different mutations were identified in the *BTD* gene, except in exon 1. This can be attributed to the fact that *BTD* has two potential AUG translation start codons; the second and more frequently used codon is located in exon 2.^{5,23,29} All mutations identified in this study were exonic, except for a single intronic variant, c.310-15delT, which was not detected in any other study conducted in the Brazilian population. *Cis* mutations have also been identified in *BTD*, which has been reported for BD in several databases.

The most common *BTD* variants observed in newborn screening in the United States are p.D444H, p.Q456H, haplotype c.1330G>C;c.511G>A (p.D444H;A171T), p.C33Ffs*36, and p.R538C, which account for about 60% of the mutant alleles.²¹ In the present study, the most frequent variants were p.D444H, haplotype c.1330G>C;c.511G>A (p.D444H;A171T), p.D543E, c.310-15delT (intronic), p.V199M, and p.H485Q, which together account for 74.6% of the alleles analysed. With the exception of the first two, these markedly differ from those reported in the United States.¹⁴ In other Brazilian studies,^{12,15} p.D444H was the most frequent variant, followed by p.C33Ffs*36 and p.D252G. These two variants were also detected in our study, but were not the most frequent. Conversely, two variants in exon 3 (seven alleles; Table 2) identified in our study have not been reported previously. Further, 11 novel variants were detected by our group.^{8,18} These observations illustrate the genetic diversity in the Brazilian population.

In four newborns with partial BD diagnosed based on their serum *BTD* activity, we detected only p.D444H variant in heterozygosis. *BTD* activity was repeated in samples collected one or two months apart. The most elevated values considered for BD classification of these four children were 1.5, 1.6, 2.1, and 2.2 nmol/min/mL, respectively. This is not compatible with the observed biochemical phenotype, because this variant usually yields *BTD* activity of approximately 75% of the reference value for normal individuals.^{11,30} On sequencing *BTD* in these patients, no mutations were found in the second allele. As described previously, gene deletions or epigenetic phenomena could be the underlying reason, as these children had at least two serum *BTD* determinations at distinct moments. However, gene deletions could not be detected by the method used in the present study. Alternative methods therefore would be necessary.^{31,32}

In the present study, the allelic frequency of the most common variant, p.D444H, was 51.5% among patients with BD, similar to that reported by another study on the Brazilian population (46.7%).¹² The frequency of the p.D444H allele in our study was estimated to be 0.016. This frequency is lower than the first reported figure of 0.039 in the United States,³² and also lower than that in the cited Brazilian report (0.04).¹² According to the 1000 Genomes Project, the frequency of rs13078881 (D444H)

varies by population, being highest among those with European ancestry (0.043), and very low (0.0023) in those with African ancestry (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs13078881).

The slave trade from Africa to Minas Gerais in the 17th–19th centuries is historically compatible with the lower frequency of the D444H allele in our study.

Although newborn BD screening is not recommended in all countries, it meets 9 of the 10 criteria set out by Andermann et al.,³³ especially in regions with a high incidence of BD, such as ours. The eighth principle that states “There should be an agreed policy on whom to treat as patients” is not entirely met, because it is not known for certain whether children with partial BD need biotin supplementation to remain symptom-free. However, treating these children, as is usually recommended,¹⁰ was demonstrated to be cost-effective in a study in Spain, where the reported incidence of combined BD in 540,000 neonates was 1:22,500.³⁴

Conclusions

The incidence of partial BD in the State of Minas Gerais may be among the highest in the world, excluding countries with high rates of consanguineous marriage. Given the high BD incidence, newborn screening plays a major role in early identification of the disease in neonates and preventing the development of symptoms and irreversible sequelae. The genotypic variability in the present study is noteworthy, and reflects the multi-ethnic population of Minas Gerais. *BTD* sequencing is a useful tool, not only to confirm BD cases screened in this newborn program, but also to obtain valuable information about genetic variability among different populations. Although BD has been included in the newborn screening program only recently, our study demonstrates that such screening is feasible, useful, and probably cost-effective in Minas Gerais.

Author contributions

Study concept and design: NOC, JNJ, RCN, MBV; acquisition of data: NOC, RCN, ALPS; molecular and biochemical analysis: NOC, GLPF, DMN, RVPL, DMC; analysis and interpretation of data: NOC, RCN, MBV; drafting of the manuscript: NOC, RCN, MBV; critical revision of the manuscript for important intellectual content: NOC, JNJ, GLPF, DMN, RVPL, DMC, ALPS, RCN, MBV; final proofreading: MBV, RCN, NOC.

Acknowledgments

The authors thank the laboratory members and scientific staff of the Center for Newborn Screening and Genetic Diagnostics (Nupad/UFMG) for their commitment and logistics, and the team responsible for following up children in the outpatient clinic. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

Declaration of conflicting interests


The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.


Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Nupad-UFMG; Brazilian Ministry of Health; and Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) to Marcos Borato Viana (grant number 305261/2017-7).

ORCID iDs

Nara de Oliveira Carvalho  <https://orcid.org/0000-0002-4564-2045>

Marcos Borato Viana  <https://orcid.org/0000-0001-9665-2115>

References

- Hymes J and Wolf B. Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clin Chim Acta* 1996; 255: 1-11.
- Wolf B, Grier RE, McVoy, et al. Biotinidase deficiency: a novel vitamin recycling defect. *J Inher Metab Dis* 1985; 8: 53-58.
- Wolf B, Grier RE, Allen RJ, et al. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta* 1983; 131: 273-281.
- McVoy JRS, Levy HL, Lawler M, et al. Partial biotinidase deficiency: clinical and biochemical features. *J Pediatr* 1990; 116: 78-83.
- Zemleni J, Hassan YI and Wijeratne SS. Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2008; 3: 715-724.
- Heur GS, McVoy JRS and Wolf B. A screening method for biotinidase deficiency in newborns. *Clin Chem* 1984; 30: 125-127.
- Wolf B. Successful outcomes of older adolescents and adults with profound biotinidase deficiency identified by newborn screening. *Genet Med* 2017; 19: 396-402.
- Lara MT, Gurgel-Giannetti J, Aguiar MJ, et al. High incidence of biotinidase deficiency from a pilot newborn screening study in Minas Gerais, Brazil. *JIMD Rep* 2015; 24: 103-107.
- Cowan TM, Blitzer MG and Wolf B. Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency. *Genet Med* 2010; 12: 464-470.
- Wolf B. Biotinidase deficiency: "if you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have". *Genet Med* 2012; 14: 565-575.
- Strovel ET, Cowan TM, Scott AI, et al. Laboratory diagnosis of biotinidase deficiency, 2017 update: a technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2017; 19: 1079.
- Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Lima SE, et al. Biotinidase deficiency: genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. *PLoS One* 2017; 12: e0177503.
- Procter M, Wolf B and Mao R. Forty-eight novel mutations causing biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 2016; 117: 369-372.
- Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Pinto LL, et al. Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 Brazilian patients. *BMC Med Genet* 2014; 15: 96.
- Neto EC, Schulte J, Ruhim R, et al. Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 295-299.
- Li H, Spencer L, Nahhas F, et al. Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by newborn screening in Michigan including an unique intronic mutation that alters mRNA expression of the biotinidase gene. *Mol Genet Metab* 2014; 112: 242-246.
- Pomponio RJ, Hymes J, Reynolds TR, et al. Mutations in the human biotinidase gene that cause profound biotinidase deficiency in symptomatic children: molecular, biochemical, and clinical analysis. *Pediatr Res* 1997; 42: 840-848.
- Carvalho NO, Del Castillo DM, Jamiário JN, et al. Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by the newborn screening program in Minas Gerais, Brazil. *Am J Med Genet A* 2019; 179: 978-982.
- Wolf B, Jensen K, Hüner G, et al. Seventeen novel mutations that cause profound biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab* 2002; 77: 108-111.
- Wolf B, Jensen KP, Barnhop B, et al. Biotinidase deficiency: novel mutations and their biochemical and clinical correlates. *Hum Mutat* 2005; 25: 413.
- Norrsgard KJ, Pomponio RJ, Hymes J, et al. 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: 20-27.
- Swango KL, Demirkol M, Hüner G, et al. Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene. *Hum Genet* 1998; 102: 571-575.
- Hymes J, Stanley CM and Wolf B. Mutations in BTD causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat* 2001; 18: 375-381.
- Wolf B. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 923-927.
- Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inher Metab Dis* 2007; 30: 430-438.
- Pinto AL, Raymond KM, Bruck I, et al. Neonatal screening for biotinidase deficiency. *Rev Saude Pública* 1998; 32: 148-152. [Portuguese]
- Luz GS, Carvalho MDB, Peloso SM, et al. Prevalence of diseases diagnosed by the Program of Neonatal Screening in Maringá, Paraná, Brazil. *Rev Gaucha Enfam* 2008; 29: 446-453. [Portuguese]
- Karaca M, Özgül RK, Ünal Ö, et al. Detection of biotinidase gene mutations in Turkish patients ascertained by newborn and family screening. *Eur J Pediatr* 2015; 174: 1077-1084.
- Pindolia K, Jordan M and Wolf B. Analysis of mutations causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat* 2010; 31: 983-991.
- Norrsgard KJ, Pomponio RJ, Swango KL, et al. Double mutation (A171T and D444H) is a common cause of profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in United States. *Hum Mutat* 1998; 11: 410-410. [Mutations in Brief #128 online (1997)]
- Wolf B. First microdeletion involving only the biotinidase gene that can cause biotinidase deficiency: a lesson for clinical practice. *Mol Genet Metab Rep* 2016; 6: 74-76.
- Senanayake DN, Jasinge EA, Pindolia K, et al. First contiguous gene deletion causing biotinidase deficiency: the enzyme deficiency in three Sri Lankan children. *Mol Genet Metab Rep* 2015; 2: 81-84.
- Andermann A, Blancoquert I, Beauchamp S, et al. Revisiting Wilson and Junger in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ* 2008; 86: 317-319.
- Vallejo-Torres L, Castilla I, Couce ML, et al. Cost-effectiveness analysis of a National Newborn Screening Program for biotinidase deficiency. *Pediatrics* 2015; 136: e424-432.

5.3 Artigo 2: Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by the Newborn Screening Program in Minas Gerais, Brazil (artigo publicado)

Received: 2 January 2019 | Revised: 24 February 2019 | Accepted: 25 February 2019
DOI: 10.1002/ajmg.a.61137



AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics **A** WILEY

RESEARCH ARTICLE

Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by the newborn screening program in Minas Gerais, Brazil

Nara O. Carvalho¹ | Dora M. del Castillo¹ | José N. Januário^{1,2} | Ana L. P. Starling^{1,3} | Rodrigo R. Arantes^{1,4} | Rocksane C. Norton^{1,3} | Marcos B. Viana^{1,3}

¹Nupad - Center for Newborn Screening and Genetic Diagnostics, UFMG - Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Department of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³Department of Pediatrics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

⁴University Hospital, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence

Nara de Oliveira Carvalho, NUPAD, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Av. Alfredo Balena 190, 5 andar, 30130-100, Belo Horizonte, Brazil.
Email: nara@nupad.medicina.ufmg.br

Funding information

Center for Newborn Screening and Genetic Diagnostics (Nupad/UFMG), Brazil, Grant/Award Number: No number; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, Grant/Award Number: 305261/2017-7

Biotinidase deficiency is an autosomal recessive inherited metabolic disorder caused by mutations in the *BTD* gene. Clinical manifestations can be treated and effectively prevented with pharmacological doses of biotin. Nine novel mutations in *BTD* are reported in 14 children diagnosed by the newborn screening program in Minas Gerais, Brazil, from June 2013 to December 2017. Serum *BTD* enzyme activity was determined for all cases and some parents. Two of the mutations are deletions and seven missense mutations located in the exonic region of the *BTD* gene, mostly in exon 4. Two newborns were profoundly biotinidase-deficient (one homozygous p.A534V [c.1601C > T] and another, double heterozygous for a novel mutation p.R211S [c.631C > A] co-inherited with an already described mutation p.T532 M [c.1595C > T]). Two mutations were associated with a partial deficiency of biotinidase (p.F361 V [c.1081 T > G] in two homozygous children, and p.S311 T [c.932G > C] in a compound heterozygous child who co-inherited a known severe mutation p.Y438X [c.1314 T > A]). The remaining five mutations were found in compound heterozygous children. Hence, a definitive conclusion about the degree of biotinidase deficiency is not possible yet. These results emphasize the importance of sequencing the *BTD* gene as an important tool to gain a better understanding of the correlation between biochemical phenotype and genotype.

KEYWORDS

biotin, biotinidase deficiency, *BTD* gene, mutation, sequencing

1 | INTRODUCTION

Biotin is a water-soluble vitamin regarded as essential because it is not synthesized by the body. Biotin is responsible for gluconeogenesis, fatty acid synthesis, and branched-chain amino acid catabolism. Biotin acts as a coenzyme for the acylation of human carboxylases such as pyruvate carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, β -methylcrotonyl-Co-A carboxylase, and acetyl-CoA (Gravel & Narang, 2005; Hymes & Wolf, 1996).

Biotinidase (*BTD*; EC 3.5.1.12) catalyzes the cleavage of biotin from dietary protein-bound biotin and is essential for recycling biotin from organic biotinyl-peptides. Biotinidase deficiency (BD, OMIM: 253260) is an autosomal recessive inherited metabolic disorder caused by mutations in the *BTD* gene (Pindolia, Jordan, & Wolf, 2010). Clinical symptoms without biotin supplementation are manifold (Zempleni, Hassan, & Wijeratne, 2008).

The diagnosis of biotinidase deficiency may be a challenge, since enzyme activity may be influenced by many variables, such as prematurity and neonatal jaundice. Sample mishandling is the most common cause of decreased biotinidase activity, and thus, of false-positive results. Additionally, borderline activity of biotinidase in well-preserved samples is sometimes detected. Hence, sequencing *BTD* can be very useful for defining the status of the individuals and making decisions about life-long treatment (Borsatto et al., 2017; Procter, Wolf, & Mao, 2016; Strovel, Cowan, Scott, & Wolf, 2017).

The *BTD* gene is composed of 543 amino acids and the mRNA consists of 4 exons, permitting the rapid sequencing of the entire complementary DNA and intron-exon junctions (Cole et al., 1994). More than 200 mutations have been recognized (Procter et al., 2016), and it is likely that the list of mutations causing biotinidase deficiency will continue to increase.

We herein report nine additional novel mutations that cause profound or partial biotinidase deficiency.

2 | MATERIALS AND METHODS

Editorial policies and ethical considerations: this study was approved by the institutional review board of the Federal University of Minas Gerais, Brazil. Written informed consent was obtained from all participants.

Individuals with biotinidase deficiency were identified by newborn screening in the state of Minas Gerais, Brazil, from June 2013 to December 2017. During this period, 1,066,888 newborns were screened and 119 were identified as biotinidase-deficient (84 patients with an enzymatic activity of up to 30%, and 35 patients in the borderline range between partial and heterozygous status or that changed categories along the course of the study).

Newborn screening for biotinidase deficiency was performed on filter paper blood spots using the semiquantitative fluorimetric assay (Neonatal biotinidase kit; Perkin Elmer, Turku, Finland), according to the manufacturer's instructions. Biotinidase deficiency was confirmed by performing enzymatic assays using serum samples, as described by Cowan, Blitzler, and Wolf (2010). The following reference values for the interpretation of the results in our lab were established in 200 randomized samples: *Normal activity*, values ranging from 5.2 to 9.5 nmol/min/mL; *suggestive of heterozygosis*, values ranging from 2.2 to 5.1 nmol/min/mL; *suggestive of partial deficiency*, values ranging from 0.8 to 2.1 nmol/min/mL; and *suggestive of profound deficiency*, values below 0.8 nmol/min/mL. When more than one measurement was available, the highest value was used for classification purposes. Children with the highest enzymatic activity of just above 2.1 nmol/min/mL, but with two other determinations in the range of partial deficiency were considered as possibly partially deficient and received oral biotin supplementation. In most cases, enzymatic assays using the parents' serum samples were also performed.

Mutation analyses were performed as previously described in the pilot study that preceded the implementation of the newborn program for BTM deficiency (Lara et al., 2015).

SIFT, PROVEAN (<http://sift.jcvi.org/>) (Choi & Chan, 2015; Kumar, Henikoff, & Ng, 2009), Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) (Schwarz, Cooper, Schuelke, & Seelow, 2014), and PolyPhen-2 (polymorphism phenotyping; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Adzhubei, Jordan, & Sunyaev, 2013) were used to analyze the possible effects of gene mutations on protein structure and function.

Biochemical and molecular tests were performed at the laboratories of the Center for Newborn Screening and Genetic Diagnostics (NUPAD - Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil). The novel variants identified in the present study were submitted to the ARUP BTM database and will be openly available at http://www.arup.utah.edu/database/BTD/BTD_display.php.

3 | RESULTS

We identified nine novel mutations in 14 newborns. Two cases were classified as profound deficient, 10 as partial deficient, and two as possibly partially deficient (Table 1). In four cases, the novel mutation

was also demonstrated in one or both parents. All novel mutations were found in the exonic region of the *BTM* gene, with seven mutations in exon 4 and two mutations in exon 2.

Of the nine mutations, two are deletions and seven are missense mutations. Two novel mutations in homozygous alleles were detected in three patients with non-consanguineous parents. Patients #1 and #2 were characterized as partially deficient and Patient #4 was characterized as profoundly deficient. These mutations were also detected in the compound heterozygous state with other known mutations in three patients (#5, #8, and #14); all of them were associated with partial deficiency. In one child (Patient #10), three mutations were detected. DNA sequencing of both parents disclosed the segregation pattern of the alleles.

The results of prediction analysis with SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, and Mutation Taster are shown in Table 2.

Clinical consequences of these mutations could not be established, since the cases were detected in the newborn period, and all children received biotin supplementation with their feeding routines and have remained asymptomatic. Patient #2 died about 1 year after the diagnosis. Unfortunately, no contact with his parents was possible to check whether his death was related to the disease.

4 | DISCUSSION

The newborn screening program of the Minas Gerais State, in Brazil, has tested 5.9 million neonates since 1994, when it was launched for detecting hypothyroidism and phenylketonuria. In 2013, biotinidase deficiency testing was included in the mandatory panel of screened diseases.

We were fortunate to carry out sample collection in more than a million newborns for screening tests in the present study, as well as the enzymatic and molecular testing procedures in the same institution; this guaranteed a standard of quality and reliability of the results, since the enzymatic tests are susceptible to external interferers, as highlighted by several authors (Cowan et al., 2010; Strovel et al., 2017).

The enzymatic activity of biotinidase in the serum, together with the *in silico* analysis of the novel variants identified in 14 patients with biotinidase deficiency, allowed us to correlate the biochemical phenotype with the genotype, and infer the effect of the variant on the protein activity.

As already stated, seven mutations were found in exon 4, which encodes the carboxy terminus of biotinidase. Mutations in the C-terminus of the protein have been shown to result in a severe loss of biotinidase activity (Iqbal et al., 2010). The two novel single nucleotide deletions led to a frameshift reading and premature stop codons that probably resulted in inactive proteins. Both mutations were found in the heterozygous state in children characterized as partially deficient for biotinidase activity, since the co-inherited allele showed a p.D444H (c.1330G > C) mutation in one case, and a c.310-15delT mutation in the other, with both alleles causing partially decreased enzyme activity, as already established (Li et al., 2014; Swango et al., 1998). Accordingly, p.Q88Rfs*10 (c.263delA) and p.K286Kfs*22 (c.858delA) mutations are most probably associated with profound deficiency when in the homozygous state or co-inherited with another "severe" mutation.

TABLE 1 Results of mutation analysis by DNA sequencing and of biotinidase activity in serum

| Patient # | Gender | Enzyme activity (nmol/min/mL) | | | Classification of enzymatic deficiency | Allele 1 (maternal) ^a | | | Allele 2 (paternal) ^a | | | | |
|----------------|--------|-------------------------------|--------|------------------|--|--|-----------------------------|----------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------|---------------|------------|
| | | Patient ^b | Mother | Father | | Nucleotide change | Effect | Exon location | Mutation type | Nucleotide change | Effect | Exon location | |
| 1 | F | 1.6/1.1/1.3/1.5 | 4.3 | NA | Partial | c.1081 T > G | p.F361 V | 4 | Missense | c.1081 T > G | p.F361 V | 4 | Missense |
| 2 ^c | M | 1.0 | NA | NA | Partial | c.1081 T > G | p.F361 V | 4 | Missense | c.1081 T > G | p.F361 V | 4 | Missense |
| 3 | M | 1.6/2.0/1.3/1.8 | 5.3 | 3.3 | Partial | c.932G > C ^d | p.S311 T | 4 | Missense | c.1314 T > A ^d | p.Y438X | 4 | Nononsense |
| 4 | M | 0.3/0.3 | 4.5 | 6.2 ^e | Profound | c.1601C > T ^d | p.A534V | 4 | Missense | c.1601C > T ^d | p.A534V | 4 | Missense |
| 5 | M | 1.9/2.1 | 3.6 | 5.1 | Partial | c.1601C > T | p.A534V | 4 | Missense | c.1330G > C | p.D444H | 4 | Missense |
| 6 | F | 1.3/2.7/1.7 | 5.0 | 4.5 | Partial (?) | c.1330G > C | p.D444H | 4 | Missense | c.263delA | p.Q88Rfs*10 | 2 | Frameshift |
| 7 | M | 0.3/0.6 | 3.5 | 4.4 | Profound | c.1595C > T | p.T532 M | 4 | Missense | c.631C > A | p.R211S | 4 | Missense |
| 8 | F | 1.8/2.1 | 4.5 | NA | Partial | c.1330G > C | p.D444H | 4 | Missense | c.1081 T > G | p.F361 V | 4 | Missense |
| 9 | F | 1.1/0.7 | 3.4 | 5.3 | Partial | c.858delA ^d | p.K286Kfs*22 | 4 | Frameshift | c.310-15delT ^d | mRNA expression | Intron 2 | Intronic |
| 10 | M | 1.4/1.4 | 3.5 | 4.3 | Partial | c.632G > T ^d / c.310-15delT ^d | p.R211L/ mRNA expression | 4/ Intron 2 | Missense/ Intronic | c.1330G > C ^d | p.D444H | 4 | Missense |
| 11 | M | 1.8/1.2 | 4.9 | 4.4 | Partial | c.1330G > C | p.D444H | 4 | Missense | c.1601C > T | p.A534V | 4 | Missense |
| 12 | M | 1.6/1.5 | 4 | NA | Partial | c.1330G > C | p.D444H | 4 | Missense | c.269 T > G | p.L90R | 2 | Missense |
| 13 | F | 2.4/2.0/1.6 | 4.8 | 3.4 | Partial (?) | c.1330G > C | p.D444H | 4 | Missense | c.832C > A | p.L278I | 4 | Missense |
| 14 | F | 1.3/1.2 | 4.8 | 3.8 | Partial | c.1081 T > G | p.F361 V | 4 | Missense | c.1455C > G | p.H485Q | 4 | Missense |

Note. Novel Mutations are shaded and set in **boldface**. NA: not available.

^aDetermined by parent DNA sequencing or presumed based on enzyme activity.

^bTests at different points of the follow-up; the highest one was used to classify enzyme deficiency as Profound, Partial, or probably Partial (?).

^cpatient died during the study.

^dAllele confirmed by parent DNA sequencing.

^ePossible false paternity or de novo mutation in the child.

TABLE 2 Results of in silico analyses

| Protein | PROVEAN | SIFT | PolyPhen-2 | Mutation taster | Biochemical phenotype |
|--------------|-------------|-----------|-------------------|-----------------|---|
| p.F361 V | Neutral | Tolerated | Benign | Polymorphism | Partial in two homozygotes and partial with p.D444H |
| p.S311 T | Deleterious | Damaging | Probably damaging | Disease causing | Partial with p.Y438X |
| p.A534V | Neutral | Tolerated | Benign | Disease causing | Profound in a homozygote and partial with p.D444H |
| p.Q88Rfs*10 | NA | NA | NA | Disease causing | Possibly partial with p.D444H |
| p.R211S | Neutral | Damaging | Probably damaging | Disease causing | Profound with p.T532 M |
| p.K286Kfs*22 | NA | NA | NA | Disease causing | Partial with c.310-15delT |
| p.R211L | Deleterious | Damaging | Probably damaging | Disease causing | Partial with c.310-15delT and D444H |
| p.L90R | Deleterious | Damaging | Probably damaging | Disease causing | Partial with c.310-15delT and D444H |
| p.L278I | Neutral | Tolerated | Probably damaging | Disease causing | Possibly partial with p.D444H |

Note. NA: Not applicable.

Among the missense mutations detected in the homozygous state, p.F361 V (c.1081 T > G) was associated with unequivocal partial deficiency of the enzymatic activity in Patients #1 and #2. However, the mutation was predicted to be "benign" by all in silico analyses. This finding illustrates that in silico prediction sometimes fails, as pointed out by Schwarz et al., 2014.

Patient #4 was homozygous for the p.A534V (c.1601C > T) mutation. He was profoundly enzyme-deficient (0.3 nmol/min/mL in two independent determinations). It is noteworthy that the in silico prediction was not uniform (see Table 2). Only the mutation taster analysis indicated that the mutation would be pathogenic. Analysis of the enzymatic activity of the parents showed that the mother was in the heterozygous range; however, the father showed a normal result, suggesting paternal discrepancy or, unlikely, a de novo mutation in the child.

The mutation p.A534V was also detected in the compound heterozygous state with p.D444H in Patient #5 and Patient #11. Both children were partially enzyme-deficient, and the test results were in agreement with the parental enzymatic activity. This is consistent with our finding that the p.A534V mutation should be classified as pathogenic.

Three missense mutations were also co-inherited with p.D444H. The mutation p.R211L in Patient #10 was detected in cis with the intronic mutation c.310-15delT, considered pathogenic by Li et al. (2014). Because the intronic mutation is present 5' to the exonic mutation, it is impossible to ascertain the pathogenicity of p.R211L. All four in silico programs predict that this mutation would, however, be pathogenic. The other two mutations (p.L90R and p.L278I) are probably pathogenic, considering that the children were both partially deficient; the parental enzyme activity results were consistent with this interpretation, and in silico analyses (see Table 2) also corroborate this classification.

Another novel mutation described in the same codon 211, p.R211S (c.631C > A), was detected in Patient #7; it was co-inherited with p.T532 M (c.1595C > T) that was considered pathogenic by Norrgard, Pomponio, Hymes, & Wolf, 1999. The patient has a profound deficiency, which leads us to infer that the p.R211S mutation is also pathogenic. Parental enzymatic activity and three in silico programs confirm this interpretation.

The p.S311 T (c.932G > C) mutation, which was detected in Patient #3, was co-inherited with p.Y438X (c.1314 T > A). This mutation was described by Neto et al. (2004) in a profoundly deficient Brazilian child. p.Y438X is a truncated protein derived from a stop codon mutation. Patient #3 was partially enzyme-deficient, his father's

enzyme activity was suggestive of heterozygosis, and his mother's enzyme activity was in the borderline of the heterozygote/normal range. Hence, the p.S311 T mutation may be a mildly pathogenic variant, functionally similar to p.D444H and E177K (c.529G > A), as previously reported by our group (Lara et al., 2015). In silico programs, however, predict that p.S311 T is pathogenic or probably pathogenic (Table 2). It is interesting to note that two other mutations in the codon 311, p.S311 N (c.932G > A), described by Norrgard et al. (1999), and p.S311 R (c.933 T > G), described by Iqbal et al. (2010), were, however, associated with biotinidase deficiency.

In addition to the usual p.D444H (c.1330G > C) mutation that causes mild partial biotinidase deficiency, this study identified another mutation (p.S311 T [c.932G > C]) with a similar functional effect on the enzyme activity; however, further cases are necessary to confirm this observation. Two mutations clearly result in severe deficiency (p.A534V [c.1601C > T] and p.R211S [c.631C > A]). For the remaining five mutations, a definitive conclusion about the degree of biotinidase deficiency is not possible with the available data. In silico program predictions and empiric data from enzyme activities in serum were sometimes discordant. The results of the present study emphasize the importance of sequencing the *BTD* gene as a complementary test to diagnose biotinidase deficiency in some newborns and as an important tool to gain a better understanding of the genotype-biochemical phenotype correlation.


ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the technical and scientific staff of the Center for Newborn Screening and Genetic Diagnostics (Nupad/UFMG), especially Gilsimary Lessa Pereira Felix, Roberto Vagner Puglia Ladeira, and Daniela Magalhães Nolasco for their involvement and logistical support, and Nupad and the Federal Ministry of Health for their financial support. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), grant number 305261/2017-7, to Marcos Borato Viana. Center for Newborn Screening and Genetic Diagnostics (Nupad/UFMG), Brazil, no specific grant number.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

ORCID

Nara O. Carvalho  <https://orcid.org/0000-0002-4564-2045>

Marcos B. Viana  <https://orcid.org/0000-0001-9665-2115>

REFERENCES

- Adzhubei, I., Jordan, D. M., & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics*, 76(1), 7.20.1-7.20.41. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>
- Borsatto, T., Sperb-Ludwig, F., Lima, S. E., Carvalho, M. R. S., Fonseca, P. A. S., Camelo, J. S., Jr., ... Schwartz, I. V. D. (2017). Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. *PLoS ONE*, 12(5), e0177503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177503>
- Choi, Y., & Chan, A. P. (2015). PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, 31(16), 2745-2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>
- Cole, H., Reynolds, T. R., Lockyer, J. M., Buck, G. A., Denson, T., Spence, J. E., ... Wolf, B. (1994). Human serum biotinidase. cDNA cloning, sequence, and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6566-6570.
- Cowan, T. M., Blitzer, M. G., Wolf, B., & Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance, C. (2010). Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency. *Genetics in Medicine*, 12(7), 464-470. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181e4cc0f>
- Gravel, R. A., & Narang, M. A. (2005). Molecular genetics of biotin metabolism: Old vitamin, new science. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(7), 428-431. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.03.020>
- Hymes, J., & Wolf, B. (1996). Biotinidase and its roles in biotin metabolism. *Clinica Chimica Acta*, 255(1), 1-11.
- Iqbal, F., Item, C. B., Vilaseca, M. A., Jalan, A., Muhl, A., Couce, M. L., ... Bodamer, O. A. (2010). The identification of novel mutations in the biotinidase gene using denaturing high pressure liquid chromatography (dHPLC). *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(1), 42-45. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.12.016>
- Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), 1073-1081. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
- Lara, M. T., Gurgel-Giannetti, J., Aguiar, M. J., Ladeira, R. V., Carvalho, N. O., Del Castillo, D. M., ... Januario, J. N. (2015). High incidence of Biotinidase deficiency from a pilot newborn screening study in Minas Gerais, Brazil. *JIMD Reports*, 24, 103-107. https://doi.org/10.1007/8904_2015_447
- Li, H., Spencer, L., Nahhas, F., Miller, J., Fribley, A., Feldman, G., ... Wolf, B. (2014). Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by newborn screening in Michigan including an unique intronic mutation that alters mRNA expression of the biotinidase gene. *Molecular Genetics and Metabolism*, 112(3), 242-246. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.04.002>
- Neto, E. C., Schulte, J., Rubim, R., Lewis, E., DeMari, J., Castilhos, C., ... Wolf, B. (2004). Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: Biochemical and molecular characterizations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(3), 295-299.
- Norgard, K. J., Pomponio, R. J., Hymes, J., & Wolf, B. (1999). Mutations causing profound biotinidase deficiency in children ascertained by newborn screening in the United States occur at different frequencies than in symptomatic children. *Pediatric Research*, 46(1), 20-27.
- Pindolia, K., Jordan, M., & Wolf, B. (2010). Analysis of mutations causing biotinidase deficiency. *Human Mutation*, 31(9), 983-991. <https://doi.org/10.1002/humu.21303>
- Procter, M., Wolf, B., & Mao, R. (2016). Forty-eight novel mutations causing biotinidase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 117(3), 369-372. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.01.002>
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*, 11(4), 361-362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
- Strovel, E. T., Cowan, T. M., Scott, A. I., & Wolf, B. (2017). Laboratory diagnosis of biotinidase deficiency, 2017 update: A technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in Medicine*, 19(10), 1079. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.84>
- Swango, K. L., Demirkol, M., Huner, G., Pronicka, E., Sykut-Cegielska, J., Schulze, A., ... Wolf, B. (1998). Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene. *Human Genetics*, 102(5), 571-575.
- Zempleni, J., Hassan, Y. I., & Wijeratne, S. S. (2008). Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, 3(6), 715-724. <https://doi.org/10.1586/174466513.6.715>

How to cite this article: Carvalho NO, del Castillo DM, Januário JN, et al. Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by the newborn screening program in Minas Gerais, Brazil. *Am J Med Genet Part A*. 2019; 1-5. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61137>

5.4 Artigo 3: Genotype-biochemical phenotype correlation in biotinidase deficient children from the Newborn Screening Program in Minas Gerais, Brazil.

Resumo

A deficiência de biotinidase (DB), doença metabólica autossômica recessiva causada por mutações no gene *BTD*, apresenta fenótipo bastante variável. A correlação do fenótipo clínico com o genótipo é tarefa difícil devido à grande variedade de sintomas e pelo fato da maioria dos dados disponíveis serem provenientes de programas de triagem neonatal, muitos autores têm buscado, então, correlacionar o fenótipo bioquímico com o genótipo e a falta dessa correlação tem sido observada com certa frequência em diversas casuísticas. O presente estudo buscou correlacionar o fenótipo bioquímico com o genótipo nos recém-nascidos (RN) diagnosticados com DB pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais. Foram analisados os resultados bioquímicos e moleculares dos 136 RN diagnosticados pelo programa. Foram identificados 45 diferentes genótipos, caracterizando alta variabilidade genotípica na população estudada, sendo a grande maioria dos RN (86%) portadora de dupla heterozigose com presença da variante mais comum, a p.D444H, em um dos alelos. Foi observada variação da atividade da biotinidase tanto no mesmo paciente, quando realizadas mais de duas dosagens séricas em momentos distintos, quanto em pacientes diferentes portadores do mesmo genótipo. Observou-se, ainda, que a atividade enzimática das variantes que fazem par com a p.D444H apresenta um espectro contínuo de variação dentro da faixa de DB parcial, até valores que já se situam na faixa de heterozigotos para variantes graves. Com base em nossos resultados constatou-se que a correlação do fenótipo bioquímico com o genótipo nem sempre é consistente, devido à variabilidade da atividade da biotinidase. Nesse contexto, recomenda-se a realização de, no mínimo, duas dosagens séricas para melhor classificação da criança. Nos casos que suscitam dúvida na classificação baseada na atividade enzimática, a determinação do genótipo pode auxiliar na decisão sobre o início da suplementação de biotina.

Key words: Biotinidase deficiency, *BTD* gene, genotype, newborn screening

Introdução

A deficiência de biotinidase (DB, OMIN:253260) é uma doença metabólica autossômica recessiva causada por mutações no gene *BTD* e na qual a obtenção e reciclagem da biotina endógena a partir da biocitina ou de peptídeos biotinilados ficam comprometidas (WOLF, 2005; ZEMPLINI; HASSAN; WIJERATNE, 2008; PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010).

A DB pode ser detectada por meio da triagem neonatal que já é realizada em mais de 30 países (WOLF; HEARD, 1990; WOLF, 1991; STROVEL *et al.*, 2017). O diagnóstico tem sido realizado pela dosagem da atividade enzimática da biotinidase no plasma por meio de teste colorimétrico (WOLF *et al.*, 1983), com base em padrões técnicos já estabelecidos (STROVEL *et al.*, 2017). Existem algumas variáveis que podem influenciar a dosagem da biotinidase, como prematuridade, icterícia neonatal, transporte e armazenamento das amostras, sendo as duas últimas as causas mais comuns que resultam em baixa atividade enzimática e, em consequência, resultados falsos-positivos. Por esse motivo, o sequenciamento do gene *BTD* é um método adicional para definição do *status* do indivíduo auxiliando no correto diagnóstico e decisão terapêutica (PROCTER; WOLF; MAO, 2016; BORSATTO *et al.*, 2017; STROVEL *et al.*, 2017). Indivíduos com deficiência profunda (menos de 10% da atividade média normal) ou parcial (10-30% da atividade média normal) devem receber suplementação oral de biotina diariamente (WOLF, 2015).

Se não tratados, os indivíduos com DB profunda podem apresentar principalmente sintomas neurológicos e cutâneos, podendo inclusive chegar ao coma ou à morte. Já os indivíduos com DB parcial tendem a apresentar sintomas mais brandos. Nesse aspecto, a triagem neonatal cumpre papel profilático importantíssimo, pois permite o tratamento precoce evitando o aparecimento de sintomas (WOLF, 2012).

A correlação do genótipo com o fenótipo clínico é tarefa difícil devido à grande variedade de sintomas (HYMES; STANLEY; WOLF, 2001; NETO *et al.*, 2004; GANNAVAPU *et al.*, 2015; BORSATTO *et al.*, 2017) e pelo fato de a maior parte dos dados disponíveis atualmente ser proveniente de programas de triagem neonatal. Assim, os recém-nascidos diagnosticados não apresentarão sintomas, pois o tratamento com biotina, iniciado precocemente inibe as manifestações clínicas, desde que a adesão ao medicamento seja mantida de forma adequada.

Já foram descritas mais de 200 variantes patogênicas no gene *BTD* e a lista não para de crescer, como aponta o banco de dados *BTD database* (http://www.arup.utah.edu/database/BTD/BTD_display.php). Um número significativo de

variantes patogênicas graves em homozigose ou em heterozigose composta tem sido associado com DB profunda. Já a heterozigose composta, em que uma das variantes é grave e a outra corresponde à p.D444H, ocasiona DB parcial. Indivíduos homozigotos para a p.D444H têm-se comportado de forma similar aos heterozigotos para variantes graves (WOLF, 2012). A falta de correlação entre o genótipo e a atividade bioquímica da enzima tem sido observada com certa frequência em diversas casuísticas. Tal divergência tem sido atribuída a fatores que podem afetar a atividade da biotinidase, como os já mencionados anteriormente, ou a outros fatores, como presença de mutações em regiões não-codificantes e fenômenos epigenéticos (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010).

O presente estudo buscou correlacionar o fenótipo bioquímico com o genótipo nos recém-nascidos diagnosticados com DB pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG).

Metodologia

Durante o período de 5 anos (junho de 2013 a maio de 2018), o PTN-MG realizou a triagem de 1.168.385 recém-nascidos (RN) para deficiência de biotinidase. Os testes de triagem neonatal, testes bioquímicos confirmatórios e moleculares foram todos realizados nos laboratórios do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (Nupad) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), conforme descrito em nossos estudos prévios (CARVALHO *et al.*, 2019a, CARVALHO *et al.*, 2019b).

Para o presente artigo, foram analisados os resultados bioquímicos e moleculares provenientes de 84 RN identificados com deficiência de biotinidase. Seis apresentaram DB profunda, definida como atividade da biotinidase abaixo de 0,8 nmol/min/mL, e 78 apresentaram DB parcial, com atividade entre 0,8 e 2,1 nmol/min/mL, inclusive. Outros 52 RN foram considerados suspeitos de portarem DB: seis apresentaram resultados bioquímicos na faixa limítrofe, ou seja até dois pontos decimais acima do valor de corte estabelecido para DB parcial (isto é, até 2,3 nmol/min/mL, inclusive) e 46 tiveram dosagens ora acima ora abaixo de 2,1 nmol/min/mL, totalizando 136 RN, conforme fluxograma (Figura 1).

Na maioria dos casos (n=131) foram realizadas pelo menos duas dosagens em momentos diferentes, sendo considerada a de valor mais elevado para classificação do paciente e decisão terapêutica. Para fins de correlação do fenótipo bioquímico com o genótipo, foi utilizada a média dos valores da atividade enzimática em cada criança.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Foi colhido termo de consentimento dos pais ou responsáveis pelas 136 crianças.

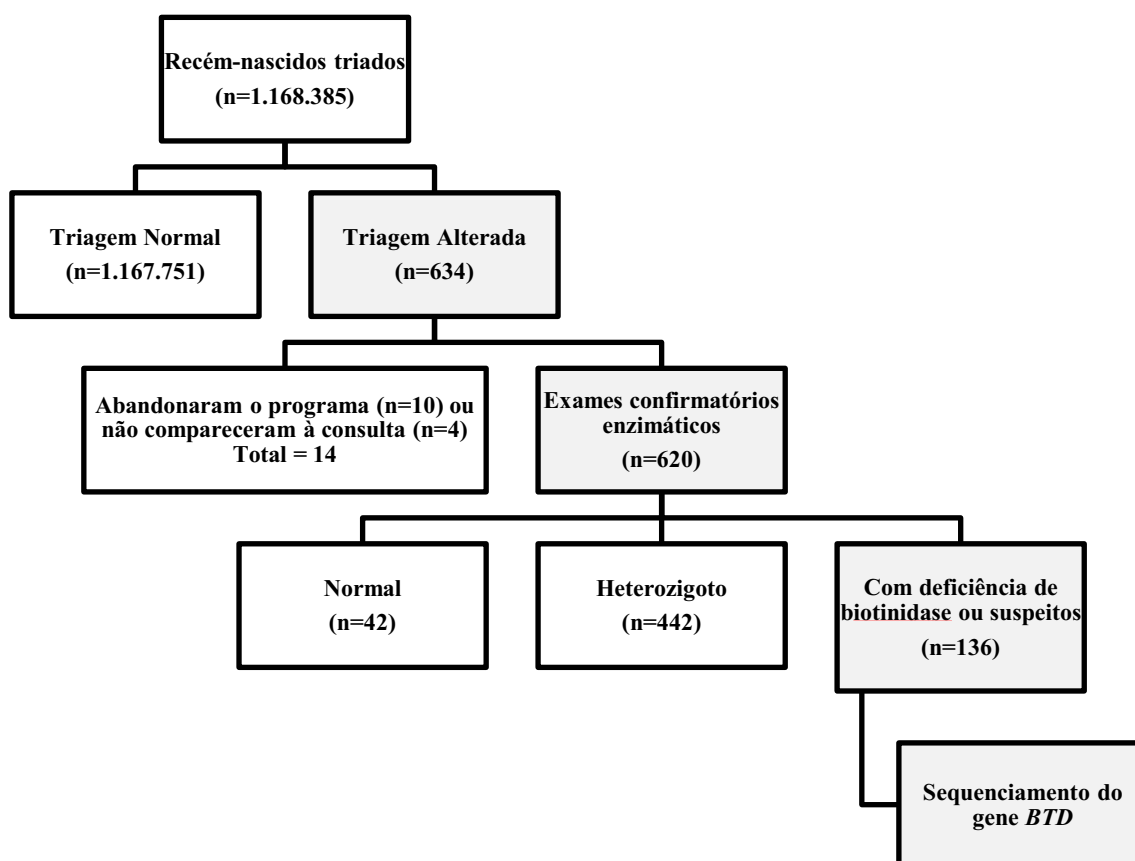


Figura 1: Fluxograma da casuística

Resultados

A análise do DNA dos 136 pacientes permitiu a identificação de 45 diferentes genótipos, incluindo variantes novas publicadas previamente (CARVALHO *et al.*, 2019). A Tabela 1 mostra o número de pacientes por genótipo, a classificação bioquímica e a média da atividade detectada da enzima BTB.

Tabela 1: Genótipos e fenótipos bioquímicos identificados em 136 crianças da triagem neonatal em Minas Gerais, Brasil

| Genótipo # | Número de pacientes por genótipo | Alelo 1 | Alelo 2 | Classificação da deficiência de biotinidase† | Média da atividade enzimática (nmol/min/mL) |
|------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|--|---|
| | | Alteração proteica | Alteração proteica | | |
| 1 | 1 | p.G114V | p.G114V | Profunda | 0,1 |
| 2 | 1 | p.A534V | p.A534V | Profunda | 0,3 |

| | | | | | |
|----|---|-----------------|---------------------|-------------|-----|
| 3 | 1 | p.R211S | p.T532M | Profunda | 0,5 |
| 4 | 1 | p.R538C | p.C33Ffs*36 | Profunda | 0,4 |
| 5 | 1 | p.[D444H;A171T] | p.[D444H;A171T] | Profunda | 0,2 |
| 6 | 1 | p.[D444H;A171T] | p.Y494C | Profunda | 0,7 |
| 7 | 1 | Intrônica¶ | p.[D444H;A171T] | Parcial | 0,9 |
| 8 | 1 | Intrônica¶ | p.K286Kfs*22 | Parcial | 1,2 |
| 9 | 2 | p.D543E | p.D543E | Parcial | 1,2 |
| 10 | 2 | p.F361V | p.F361V | Parcial | 1,2 |
| 11 | 1 | p.F361V | p.H485Q | Parcial | 1,3 |
| 12 | 1 | p.S311T | p.Y438X | Parcial | 1,7 |
| 13 | 1 | p.[V199M;C471C] | p.[V199M;C471C] | Parcial | 1,2 |
| 14 | 1 | p.[V199M;C471C] | p.H485Q | Parcial | 1,1 |
| 15 | 1 | p.[V199M;C471C] | p.D252G | Parcial | 0,8 |
| 16 | 1 | p.[V199M;C471C] | p.R122G | Parcial | 0,8 |
| 17 | 5 | p.D444H | p.G114V | Parcial | 1,6 |
| 18 | 3 | p.D444H | p.Y438X | Parcial | 1,5 |
| 19 | 2 | p.D444H | p.A534V | Parcial | 1,8 |
| 20 | 2 | p.D444H | p.D252G | Parcial | 1,3 |
| 21 | 2 | p.D444H | p.L40P | Parcial | 1,7 |
| 22 | 1 | p.D444H | p.A281V | Parcial | 1,1 |
| 23 | 1 | p.D444H | p.[Intrônica;R211L] | Parcial | 1,4 |
| 24 | 1 | p.D444H | p.[D444H;R157H] | Parcial | 1,6 |
| 25 | 1 | p.D444H | p.[W409Cfs*91] | Parcial | 1,6 |
| 26 | 1 | p.D444H | p.R538H | Parcial | 1,6 |
| 27 | 1 | p.D444H | p.T532M | Parcial | 1,4 |
| 28 | 1 | p.D444H | p.V457A | Parcial | 1,8 |
| 29 | 1 | p.D444H | p.Y93C | Parcial | 1,6 |
| 30 | 1 | p.D444H | p.A237T | Hz | 1,9 |
| 31 | 1 | p.D444H | p.L278I | Hz | 2,0 |
| 32 | 1 | p.D444H | p.L90R | Hz | 2,4 |
| 33 | 1 | p.D444H | p.Q88Rfs*10 | Hz | 1,9 |
| 34 | 1 | p.D444H | p.R157H | Bd | 2,0 |
| 35 | 2 | p.D444H | p.F361V | Parcial (1) | 2,0 |
| | | | | Bd (1) | 2,3 |
| 36 | 4 | p.D444H | Normal | Parcial (3) | 1,6 |
| | | | | Bd (1) | 2,2 |
| 37 | 6 | p.D444H | p.C33Ffs*36 | Parcial (5) | 1,7 |
| | | | | Hz (1) | 2,0 |
| 38 | 6 | p.D444H | p.H485Q | Parcial (3) | 1,6 |
| | | | | Hz (3) | 2,3 |
| 39 | 4 | p.D444H | p.[P497S;Y428Y] | Parcial (3) | 1,6 |
| | | | | Hz (1) | 2,5 |
| 40 | 6 | p.D444H | p.Q456H | Parcial (5) | 1,7 |
| | | | | Bd (1) | 1,8 |
| 41 | 3 | p.D444H | p.[V199M;C471C] | Parcial (1) | 1,9 |

| | | | | | |
|----|----|---------|-----------------|--------------|-----|
| | | | | Hz (2) | 2,4 |
| 42 | 6 | p.D444H | Intrônica¶ | Parcial (2) | 1,9 |
| | | | | Hz (4) | 2,3 |
| 43 | 13 | p.D444H | p.D543E | Parcial (4) | 1,9 |
| | | | | Bd (1) | 2,3 |
| | | | | Hz (8) | 2,1 |
| 44 | 18 | p.D444H | p.[D444H;A171T] | Parcial (15) | 1,6 |
| | | | | Bd (2) | 1,7 |
| | | | | Hz (1) | 1,7 |
| 45 | 23 | p.D444H | p.D444H | Parcial (2) | 1,5 |
| | | | | Bd (1) | 2,2 |
| | | | | Hz (20) | 2,4 |

† Classificação baseada no valor mais elevado da atividade de biotinidase (duas ou mais amostras em tempos distintos, para cada criança): profunda, < 0,8 nmol/min/mL; parcial, entre 0,8 e 2,1 nmol/min/mL; *borderline* (Bd), 2,2 e 2,3 nmol/min/mL; heterozigoto (Hz), 2,4 a 5,1 nmol/min/mL.

Em negrito as variantes novas identificadas no estudo (Carvalho et al, 2019)

¶ Mutação intrônica: c.310-15delT

Excetuado o genótipo homozigoto para p.D444H, presente em 23 casos (16,9%), os genótipos mais frequentes na popula o estudada foram p.D444H/p.[D444H;A171T] e a p.D444H/p.D543E com 13,3% e 9,6% dos pacientes, respectivamente.

Foram detectadas oito variantes em homozigose em 31 casos, sendo que 23 foram homozigotos para p.D444H, como já mencionado. Os genótipos homozigotos (#1, #2 e #5) causaram a redu o da atividade enzimática em 98,6%, 95,9% e 97,2% respectivamente, caracterizando deficiência profunda da biotinidase. Os genótipos #9, #10 e #13 apresentaram a mesma atividade média da biotinidase de 16,5%, caracterizando deficiência parcial da biotinidase. Já o genótipo homozigoto para p.D444H (#45) foi associado a mais de uma classifica o bioquímica em testes realizados com amostras colhidas em tempos distintos. Em 20 casos, houve mudança na classifica o enzimática, seja deficiência parcial ou “heterozigoto”, este muito mais frequente. Um caso teve duas determina es na faixa limítrofe (2,2 nmol/min/mL) e dois pacientes mantiveram dosagens consecutivas na faixa de deficiência parcial (um, com 1,5 e 1,0 nmol/min/mL e outro, com duas dosagens 1,6 nmol/min/mL). O Gráfico 1A ilustra a varia o dos valores médios da atividade da BTB nesses 23 casos. Se os valores médios dos testes fossem usados para classificar essas crianças, quatro teriam deficiência parcial e 19 estariam na faixa de valores encontrados em indivíduos heterozigotos para variantes patog nicas “graves”.

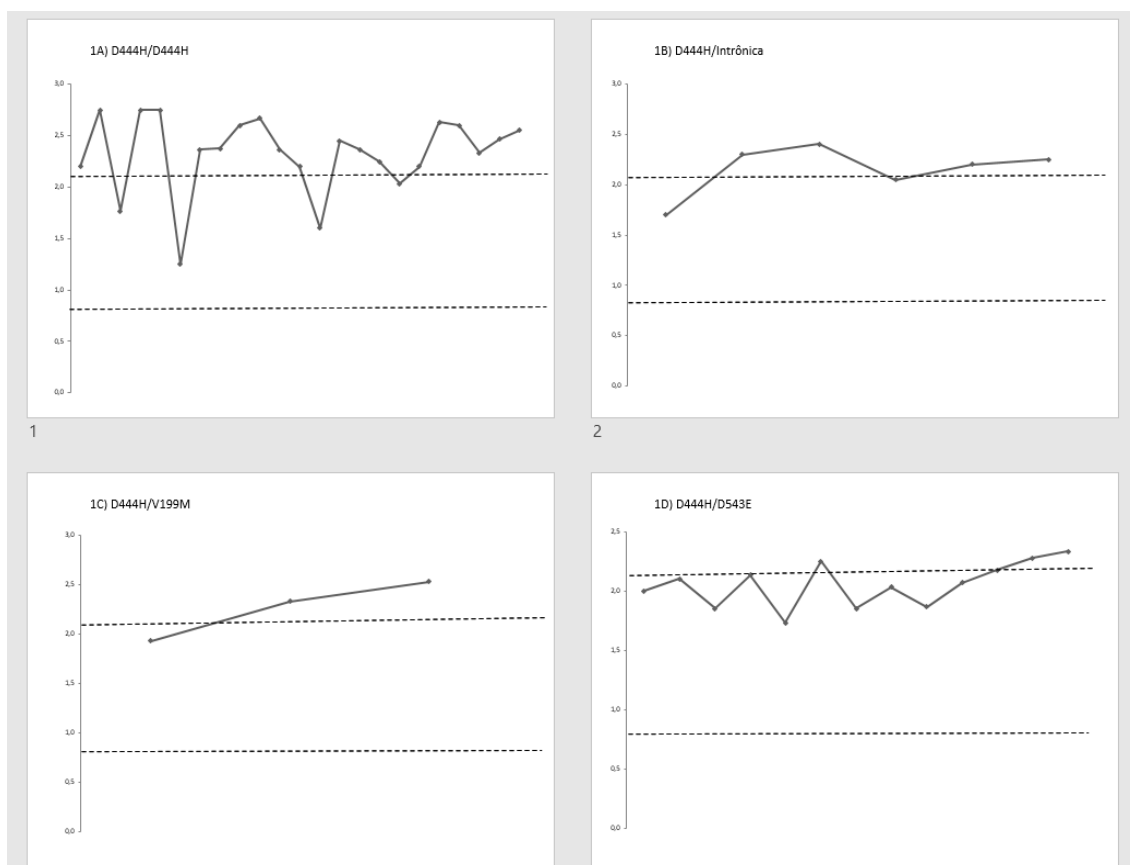


Gráfico 1: Variação bioquímica da atividade da biotinidase (nmol/min/mL) em crianças com o mesmo genótipo - A: D444H/D444H; B: D444H/c.310-15delT (intrônica); C: D444H/[V199M;C471C]; D: D444H/D543E.

Os pacientes que apresentaram genótipo heterozigoto composto contendo a variante p.D444H e uma segunda variante sabidamente patogênica “grave” apresentaram dosagens enzimáticas mostrando variação sempre dentro da faixa para deficiência parcial, fato bem evidenciado para os genótipos detectados em um número maior de pacientes, como p.D444H/p.[D444H;A171T], p.D444H/p.Q456H e p.D444H/p.C33Fs*36.

Já na p.D444H em heterozigose composta com variantes sabidamente associadas a efeito mais brando, como a alteração intrônica (c.310-15delT), p.V199M, p.D543E e p.F361V, observaram-se variações mais próximas ao ponto de corte superior para deficiência parcial ou, então, na faixa *borderline*, sendo que a variante p.L90R apresentou variabilidade maior na atividade da biotinidase. O comportamento bioquímico dos genótipos com a mutação intrônica

(c.310-15delT) ou com as variantes p.V199M e p.D543E pode ser observado nos Gráficos 1B, 1C e 1D, respectivamente. As outras duas variantes (p.F361V e p.L90R) não foram plotadas em gráfico por estarem presentes em apenas dois e um paciente, respectivamente.

Foram identificados quatro pacientes em heterozigose simples para a p.D444H (genótipo #36), sendo três com fenótipo bioquímico de deficiência parcial (19,3%, 19,3% e 27,5% de atividade média enzimática) e um paciente com atividade média de 30,3%, resultados estes incompatíveis com a atividade esperada de 75% do valor de referência.

O Gráfico 2 ilustra os valores médios da atividade da BTB em 28 genótipos identificados em 95 crianças portadoras de dupla heterozigose para p.D444H e outra variante. Observa-se variação contínua dos valores que correspondem a atividades entre 15% e 33% do valor médio de referência para o laboratório.

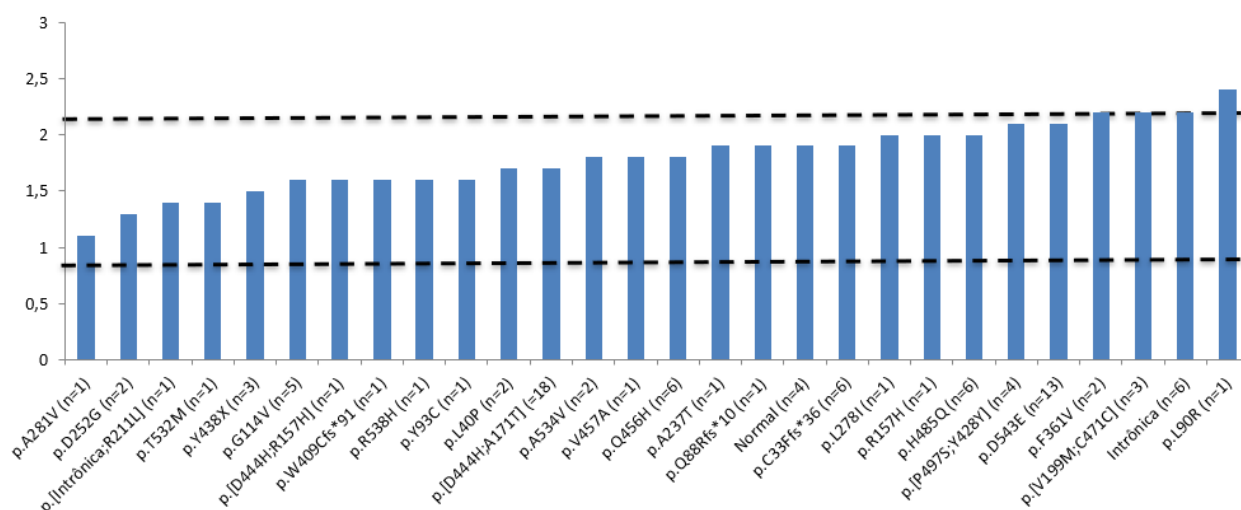


Gráfico 2: Atividade da biotinidase em genótipo heterozigoto composto contendo a variante p.D444H

O Gráfico 3 ilustra os valores mínimos e máximos da atividade da BTB em 22 crianças que tiveram quatro ou mais dosagens realizadas em momentos distintos durante o estudo. Percebe-se que a variabilidade dos valores da atividade da BTB ocorre não só entre genótipos diferentes, como já referido no Gráfico 2, mas também no mesmo indivíduo. Ressalte-se que não foi observada prematuridade quando da coleta das amostras nessas crianças.

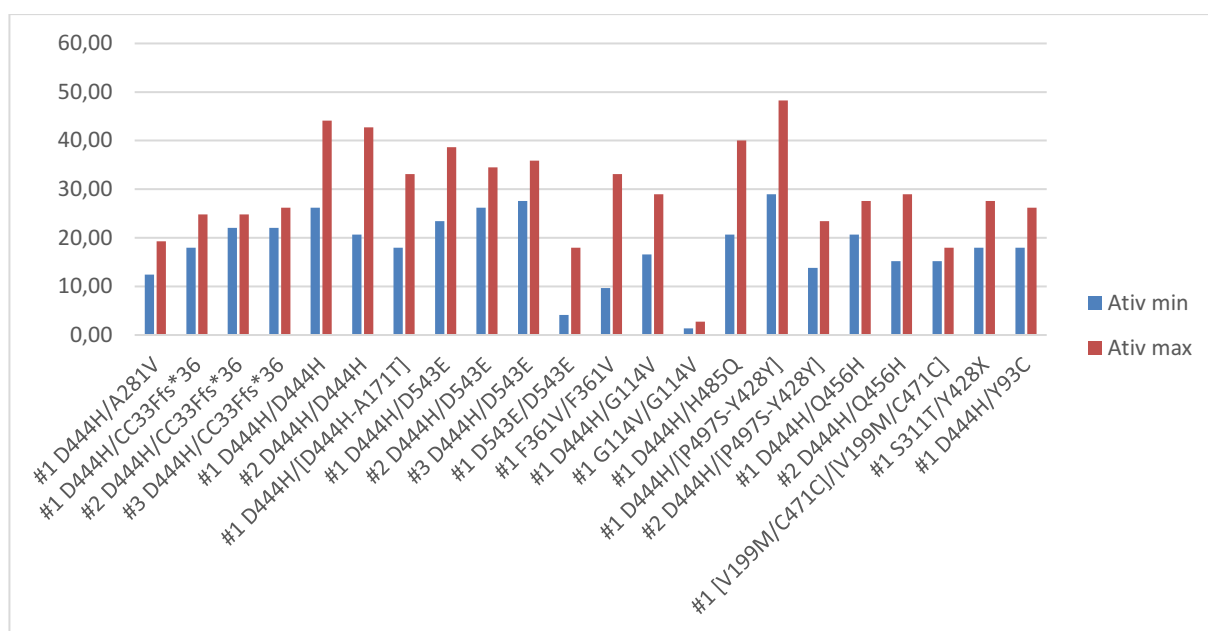


Gráfico 3: Valores mínimos e máximos da atividade enzimática da biotinidase em relação à média dos valores de referência (%) nos pacientes de triagem neonatal com mais de quatro dosagens em momentos distintos

Discussão

O estudo correlacionou o perfil bioquímico com o diagnóstico genético de recém-nascidos que foram identificados com deficiência de biotinidase (atividade enzimática de até 30% da média de referência no laboratório Nupad-UFMG) ou com suspeita de DB (valores limítrofes ou cambiantes). Foram triados em Minas Gerais mais de um milhão de recém-nascidos durante o estudo e a incidência da DB combinada foi de 1:13.909 nascidos vivos (CARVALHO *et al.*, 2019b).

O estudo molecular do gene *BTD* nas 136 crianças identificou 45 diferentes genótipos, caracterizando alta variabilidade genotípica na população estudada, fato provavelmente relacionado à composição multipopulacional do estado de Minas Gerais. Os genótipos mais frequentes no presente estudo (p.D444H/p.D444H, o haplótipo p.D444H/p.[D444H;A171T] e a p.D444H/p.D543E) não diferem muito dos identificados no estudo de Borsatto et al (2017) que também analisou o diagnóstico bioquímico e molecular em pacientes brasileiros. Estudo realizado por Norrgard et al (1999) constatou maior variabilidade genotípica entre os casos diagnosticados por triagem neonatal quando comparado ao grupo de pacientes sintomáticos, sendo que duas das variantes mais comuns no grupo de triagem neonatal (variantes

p.D444H/p.A171T e p.Q456H) e que não haviam sido detectadas em pacientes sintomáticos, também foram detectadas entre as mais frequentes no presente estudo.

A correlação do fenótipo com o genótipo na DB é assunto ainda em estudo e, para algumas variantes já catalogadas em bancos de dados, com resultados díspares em diferentes relatos. A variabilidade da atividade enzimática das diversas variantes, conforme corroboram no presente estudo e também outros autores (Borsatto *et al.*, 2017; Yilmaz *et al.*, 2018), a descrição de novas variantes, a ocorrência de dupla heterozigose, em detrimento de variantes em homozigose, na maioria das regiões em que a prevalência de consanguinidade é baixa e, principalmente, o fato de os dados gerados nos estudos mais recentes e com número mais elevado de casos serem de indivíduos assintomáticos identificados pelos programas de triagem neonatal, tornam pouco provável que a história natural de várias variantes venha a ser conhecida (HYMES; STANLEY; WOLF, 2001; WOLF, 2012). Dessa forma, muitos autores vêm tentando correlacionar o fenótipo bioquímico com o genótipo, seja *in vivo*, *in vitro* ou *in silico*. O presente estudo pretendeu colaborar nessa discussão, uma vez que o número de casos para alguns genótipos foi relativamente elevado e a determinação da atividade enzimática no soro foi cuidadosamente padronizada e repetida, no mínimo, duas vezes para cada criança, além da determinação da atividade de BTB em ambos os genitores. Em 22 crianças, ela foi feita pelo menos quatro vezes, o que permitiu comprovar a variabilidade no próprio indivíduo (Gráfico 3), conforme também constatado por outros autores (BORSATTO *et al.*, 2017; YILMAZ *et al.*, 2018). A grande variabilidade nos resultados do teste enzimático quantitativo da biotinidase pode ser atribuída a existência de fatores epigenéticos, bioquímicos e fatores inerentes ao indivíduo (PINDOLIA; JORDAN; WOLF, 2010).

A atividade enzimática da BTB em pacientes homozigotos evidenciou, conforme esperado, que as variantes p.G114V e p.[D444H;A171T] levaram à redução drástica na atividade enzimática, causando deficiência profunda nos pacientes. A variante p.A534V, descrita em estudo prévio (CARVALHO *et al.*, 2019a), também foi associada a DB profunda. A variante p.V199M, por sua vez, causou atividade enzimática abaixo de 30%, caracterizando DB parcial, o que confirma a suspeita do autor que primeiramente identificou essa variante (WOLF *et al.*, 2002) e os relatos de outros autores de que essa variante tenha efeito menos deletério na atividade da BTB (NETO *et al.*, 2004; BORSATTO *et al.*, 2014). Em heterozigose com p.D444H, confirmou-se essa constatação (Gráfico 1C). A variante p.D543E detectada, em homozigose em dois neonatos na presente casuística e em um caso adicional no estudo piloto precedente (LARA *et al.*, 2015), também associa-se à deficiência parcial. Quando em heterozigose composta com a p.D444H em 13 casos (Gráfico 1D), a atividade enzimática ou

situou-se na faixa de DB parcial ou ligeiramente acima do valor limítrofe, confirmando tratar-se de variante com efeito mais brando sobre a atividade da BTB, diferentemente do relatado por outros autores que a classificaram como patogênica Procter et al (2016). A variante p.F361V, detectada em homozigose em dois recém-nascidos não pertencentes à mesma família (CARVALHO *et al.*, 2019a), e em outros dois casos em heterozigose composta com a p.D444H e p.H485Q, respectivamente, também associou-se a efeitos menos deletérios sobre a atividade da BTB.

Dentre as 23 crianças homozigotas para p.D444H, em que o esperado era atividade enzimática em torno de 48% a 50% (SWANGO *et al.*, 1998), observou-se que duas delas mantiveram dosagens consecutivas na faixa de deficiência parcial, nestes casos podemos suspeitar de deleção do alelo complementar, levando ao quadro de “falsa homozigose” (STROVEL *et al.*, 2017) ou, então, de fenômenos epigenéticos ainda a serem desvendados. Para essas duas crianças, foi mantido o tratamento com biotina. Nos outros 21 pacientes, a atividade da BTB teve grande variabilidade, oscilando, no mesmo indivíduo, entre as faixas de DB parcial e de heterozigoto para variantes severas (Gráfico 3), fato este que reforça a recomendação de que seja realizada mais de uma determinação sérica para se aferir o real *status* de crianças com atividade de BTB perto do valor limítrofe para DB parcial. É preciso destacar, ainda, que 93% das crianças homozigotas para p.D444H, detectadas por PCR alelo-específica no Programa de Triagem Neonatal em Minas Gerais, possuem, como esperado, atividade de BTB na faixa de heterozigoto para variantes patogênicas severas (CARVALHO *et al.*, 2019b). Na tentativa de investigar essa variação, estudo recente (BORSATTO *et al.*, 2019) avaliou o efeito *in vitro* do alelo p.D444H sobre a atividade da BTB em lisado de células HEK 293 e, também, no meio de cultura no qual cresciam essas células. Os resultados conduziram os autores a especularem de que p.D444H esteja associada a instabilidade da enzima e não a uma atividade reduzida da mesma.

Confirmou-se que a DB parcial é, na maior parte das vezes (86% dos casos no presente estudo), devida à combinação do alelo p.D444H com variantes associadas a DB profunda (SWANGO *et al.*, 1998). Nesses casos, observou-se que a atividade média da BTB para cada combinação assumiu valores que cobrem toda a faixa correspondente à DB parcial (Gráfico 2). Isso corresponde, provavelmente, ao efeito enzimático variável da variante que faz par com a p.D444H.

Em quatro recém-nascidos com DB parcial ou na região limítrofe superior, identificou-se a variante p.D444H em heterozigose simples (genótipo #36 da Tabela 1). A explicação mais plausível para a discordância com o fenótipo bioquímico esperado (75% de atividade) é que

existam outras alterações no gene *BTD* não detectáveis por sequenciamento (WOLF, 2016; SENANAYAKE *et al.*, 2015) ou, então, fenômenos epigenéticos ainda desconhecidos, uma vez que a atividade da BTD foi feita duas ou três vezes nessas crianças, com estrita observância na coleta e processamento do sangue.

Conclusão

Com base em nossos resultados e considerando o tamanho significativo da amostra estudada, a variação enzimática observada e a correlação algumas vezes falha com o genótipo, recomendamos, à semelhança de Borsatto et al (2017), que se realizem no mesmo laboratório de referência pelo menos duas determinações da atividade sérica da BTD em momentos distintos para se confirmar o resultado de cada caso suspeito de DB, e uma terceira determinação em caso de discrepância entre as duas primeiras. A escolha do maior valor da atividade da BTD para fins de classificação do paciente e decisão terapêutica talvez não seja a mais adequada, adotando-se, como alternativa, o valor médio das três dosagens. A determinação da atividade sérica da BTD continua sendo o padrão ouro para confirmação do diagnóstico da DB, pela possibilidade de interferência de fatores epigenéticos e outros na atividade da BTD variante, a realização do sequenciamento do gene *BTD* para conhecimento do genótipo, principalmente nos casos com classificação bioquímica duvidosa, cumpre papel relevante na categorização mais segura da DB e consequente suplementação de biotina à criança afetada.

Referências

Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Blom HJ, Schwartz IV. Effect of BTD gene variants on in vitro biotinidase activity. *Mol Genet Metab.* 2019;127(4):361-367.

Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Lima SE, Carvalho MRS, Fonseca PAS, Camelo JS, et al. Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177503. Erratum in: *PLoS One.* 2017 Jun 22;12 (6):e0180463.

Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Pinto LL, Luca GR, Carvalho FL, Souza CF, et al. Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 Brazilian patients. *BMC Med Genet.* 2014;15:96.

Carvalho NO, Del Castillo DM, Januário JN, Starling ALP, Arantes RR, Norton RC, Viana MB. Novel mutations causing biotinidase deficiency in individuals identified by the newborn screening program in Minas Gerais, Brazil. *Am J Med Genet A.* 2019a; 179(6):978-982.

Carvalho NO, Januário JN, Felix JLP, et al. High incidence of partial and profound biotinidase deficiency in neonates in Minas Gerais, Brazil. 2019b. *Aceito preliminarmente para publicação na revista Journal of Medical Screening (em processo de revisão)*.

Gannavarapu S, Prasad C, DiRaimo J, Napier M, Goobie S, Potter M, et al. Biotinidase deficiency: Spectrum of molecular, enzymatic and clinical information from newborn screening Ontario, Canada (2007-2014). *Mol Genet Metab*. 2015 Nov;116(3):146-51

Hymes J, Stanley CM, Wolf B. Mutations in BTD causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat*. 2001 Nov;18(5):375-81.

Neto EC, Schulte J, Rubim R, Lewis E, DeMari J, Castilhos C, et al.. Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Mar;37(3):295-9.

Norrgard KJ, Pomponio RJ, 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.

Pindolia K, Jordan M, Wolf B. Analysis of mutations causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat*. 2010 Sep;31(9):983-91.

Procter M, Wolf B, Mao R. Forty-eight novel mutations causing biotinidase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2016 Mar;117(3):369-72

Senanayake DN, Jasinge EA, Pindolia K, et al. First contiguous gene deletion causing biotinidase deficiency: The enzyme deficiency in three Sri Lankan children. *Mol Genet Metab Rep* 2015; 2:81-84.

Strovel ET, Cowan TM, Scott AI, Wolf B. Laboratory diagnosis of biotinidase deficiency, 2017 update: a technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2017 Oct;19(10). Erratum in: *Genet Med*. 2017 Dec 14.

Swango KL, Demirkol M, Hüner 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.

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 Jul 15;131(3):273-81.

Wolf B, Heard GS. Screening for biotinidase deficiency in newborns: worldwide experience. *Pediatrics*. 1990 Apr;85(4):512-7.

Wolf B. Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 1991;14(6):923-7.

Wolf B, Jensen K, Hüner 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.

Wolf B. Biotinidase: its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism. *J Nutr Biochem*. 2005 Jul;16(7):441-5.

Wolf B. Biotinidase deficiency: "if you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have". *Genet Med*. 2012 Jun;14(6):565-75.

Wolf B. Why screen newborns for profound and partial biotinidase deficiency? *Mol Genet Metab*. 2015 Mar;114(3):382-7.

Wolf B. First microdeletion involving only the biotinidase gene that can cause biotinidase deficiency: A lesson for clinical practice. *Mol Genet Metab Rep* 2016; 6:74-76.

Yilmaz BS, Mungan NO, Kor D, Bulut D, Seydaoglu G, Öktem M, et al. Twenty-seven mutations with three novel pathogenic variants causing biotinidase deficiency: a report of 203 patients from the southeastern part of Turkey. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2018 Mar 28;31(3):339-343

Zempleni J, Hassan YI, Wijeratne SS. Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2008 Nov 1;3(6):715-724.

6. Considerações finais

Este estudo nos permitiu estimar a incidência combinada da DB parcial e profunda no estado de Minas Gerais na proporção de um para cada 13.909 nascidos vivos, podendo ser considerada uma das mais altas do mundo, excluindo-se os países com altas taxas de consanguinidade. Foi observada que a incidência da forma parcial é a responsável pela alta incidência da doença na população estudada e isso se deve à combinação da variante mais comum, p.D444H, com outras variantes “graves” da DB. A baixa frequência de homozigose faz com que a incidência da DB profunda seja bem menor na nossa população.

Neste cenário, a triagem neonatal para DB cumpre papel muito relevante, pois permite a identificação precoce dos neonatos acometidos, propiciando tratamento adequado e evitando a ocorrência de sintomas e de sequelas irreversíveis.

A partir da análise molecular do gene *BTD* nos recém-nascidos diagnosticados com deficiência de biotinidase pelo PTN-MG no período do estudo, foi possível identificar as variantes presentes nos pacientes, incluindo nove variantes novas, as quais foram descritas pelo presente estudo e já se encontram publicadas no banco de dados *BTD database* (https://arup.utah.edu/database/BTD/BTD_display.php).

Foi estabelecida a frequência relativa das variantes identificadas nos pacientes com DB, sendo a p.D444H, p.[D444H;A171T], p.D543E, mutação intrônica (c.310-15delT), p.V199M e p.H485Q as variantes mais frequentes na população estudada. A grande variabilidade genotípica observada pode ser atribuída à origem multiétnica da população mineira. A frequência do alelo p.D444H na população de triagem neonatal foi estimada em em 0,016 (1,6%), considerada relativamente baixa em comparação com outras populações.

A partir da análise do perfil bioquímico da atividade enzimática da biotinidase, pode-se concluir que existe uma variação contínua dos valores e que esta variabilidade ocorre tanto no mesmo paciente quanto em pacientes diferentes com o mesmo genótipo. Dada essa variação, a correlação do fenótipo bioquímico com o genótipo, principalmente na presença de dupla heterozigose, pode não ser consistente. Considerando a existência desse comportamento bioquímico variável, recomenda-se que se realizem pelo menos duas dosagens séricas enzimáticas em momentos distintos e uma terceira em caso de divergência na classificação, de tal forma a se obter maior segurança para iniciar a suplementação de biotina.

Com base nos resultados do presente estudo, concluiu-se que a escolha do maior valor da dosagem sérica para fins de classificação da criança testada, pode não ser a mais adequada, dada a ocorrência de vários fatores que podem interferir no comportamento da atividade

enzimática. Dessa forma optar pela média dos valores de duas ou três dosagens enzimáticas para classificação do paciente seja mais indicada do que a conduta atual de adotar o valor mais elevado. Apesar do teste quantitativo da biotinidase ser o padrão-ouro para o diagnóstico, recomenda-se o sequenciamento do gene *BTD* como método complementar para auxiliar no correto diagnóstico, propiciando indicação terapêutica mais segura ao paciente, principalmente para os casos com variação na dosagem enzimática que determinaria a mudança de classificação, de DB parcial para a faixa de heterozigotos com variante severa.

Os resultados do estudo nos permitiram ainda concluir que o programa de triagem neonatal para DB em Minas Gerais pode ser considerado de alta qualidade, e isso se deve aos protocolos, métodos utilizados, equipes técnica e clínica multidisciplinar especializada. Considera-se, portanto, que a triagem neonatal para DB em Minas Gerais é viável, útil e provavelmente efetiva sob o ponto de vista econômico.

7 Perspectivas Futuras

- Continuar realizando o sequenciamento do gene *BTD* para os pacientes identificados com atividade reduzida da biotinidase como parte do protocolo de triagem neonatal de forma a auxiliar na classificação do paciente.
- Refazer a análise do perfil bioquímico da população de triagem neonatal de forma a se confirmar os valores dos pontos de corte atualmente estabelecidos para categorizar o grau de deficiência da atividade da biotinidase.
- Com maior número de pacientes caracterizados ao longo dos anos, reanalisar a correlação do fenótipo bioquímico com o genótipo, de forma a melhor esclarecer essa questão.
- Estudar os casos de pais e irmãos de pacientes assintomáticos que só tiveram o diagnóstico da doença após a triagem neonatal de um membro da família.

8 Conclusões

- A incidência combinada da DB parcial e profunda foi estimada em 1:13.909 nascidos vivos (intervalo de confiança a 95%, 1:11.235 a 1:17.217), bem mais alta do que a média mundial. A incidência da DB profunda foi estimada em 1:194.731 (1:89.286 a 1:1.424.809) e a DB parcial em 1:14.979 nascidos vivos (1:12.003 a 1:18.692).
- A partir do estudo molecular do gene *BTD*, foi possível identificar 36 diferentes variantes nos recém-nascidos diagnosticados com DB pelo PTN-MG, sendo as variantes mais comuns p.D444H, p.D444H;A171T (haplótipo c.1330G>C;c.511G>A), p.D543E, intrônica (c.310-15delT), p.V199M e p.H485Q que juntas representam 74,6% dos alelos analisados. Dentre as variantes detectadas, nove foram descritas pela primeira vez no presente estudo.
- A frequência do alelo p.D444H na população de triagem neonatal foi estimada em 0,016%, menor do que a registrada em outras populações.
- Os resultados do estudo corroboram com os de outros autores de que a correlação do fenótipo bioquímico (atividade enzimática no soro) com o genótipo não é sempre consistente, dada a influência de possíveis fatores bioquímicos e epigenéticos na modulação da atividade da biotinidase.

9 Anexos

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

O Sr.(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “**Caracterização bioquímica e molecular das formas graves e parciais da deficiência de biotinidase no Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais: estudo prospectivo de 5 anos**”. Pedimos a autorização para coleta de amostra de sangue de seu filho, e quando necessário, coleta de amostra de seu sangue, a utilização do material biológico coletado está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se o Sr. (a) concordar em projetos futuros. Nesta pesquisa pretendemos realizar um exame de DNA para identificar a alteração genética (mutação) responsável pela doença “Deficiência de **biotinidase**” identificada pelo teste de triagem neonatal (teste do pezinho) do seu filho. O acompanhamento clínico do seu filho no Ambulatório de **Biotinidase** do Serviço Especial de Genética do Hospital das Clínicas (SEG/HCUFGM) não sofrerá qualquer modificação. Para a finalidade da pesquisa no dia em que a criança comparecer à consulta médica de rotina, prestados os devidos esclarecimentos sobre a realização dos exames, vocês serão encaminhados para a coleta de uma amostra de sangue no posto de coleta do **Nupad**. Essa amostra será armazenada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do **Nupad** até o final da pesquisa. Os riscos e desconfortos envolvidos na pesquisa consistem no procedimento de coleta de sangue periférico por punção venosa, o que pode acarretar dor local no momento da coleta.

A pesquisa contribuirá, de forma geral, para um entendimento mais aprofundado da correlação dos exames bioquímicos (teste quantitativo enzimático realizado pelo Teste do Pezinho) com os exames moleculares (exame de DNA) de forma a se confirmarem os valores do ponto de corte atualmente utilizados para o diagnóstico da Deficiência de **Biotinidase** no Teste do Pezinho; e em particular, propiciará indicação mais segura do tratamento mais adequado para as crianças identificadas com deficiência de **Biotinidase** no Teste do Pezinho.

Para participar deste estudo o Sr.(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. O Sr.(a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que **desejar** e estará livre para participar ou recusar-se a participar em qualquer momento e sem quaisquer prejuízos. A sua participação é voluntária, e a recusa não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma que o seu filho é atendido pelo pesquisador ou médico responsável, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa a partir de seu material biológico e/ou de seu filho serão encaminhados para o médico responsável assim que finalizados.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do **Nupad**, e a outra será fornecida ao Sr.(a). Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador por um período de 5 (cinco) anos no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do **Nupad** – Faculdade de Medicina/UFMG e após este tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (resoluções N°466/12; 441/11 e a portaria 2.201 do Conselho Nacional de saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.



Eu _____ portador do documento de identidade _____ fui informado(a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa **“Caracterização bioquímica e molecular das formas graves e parciais da deficiência de biotinidase no Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais: estudo prospectivo de 5 anos”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Concordo que o material biológico de meu filho, bem como o meu se houver, seja utilizado somente para esta pesquisa.

Concordo que o material biológico de meu filho, bem como o meu se houver, possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Rubrica do pesquisador _____

Rubrica do participante ou responsável pela criança _____

Declaro que concordo em participar desta pesquisa e autorizo a participação do meu filho. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler, ou foi lido para mim, e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo da criança _____

Nome completo do responsável _____

Data _____

Assinatura do responsável _____

Médicos responsáveis pelo atendimento médico: Ana Lúcia Pimenta Starling, Rodrigo Arantes, Valéria Oliveira e Rocksane de Carvalho Norton.

Pesquisadores responsáveis: Nara de Oliveira Carvalho, Marcos Borato Viana, Rocksane de Carvalho Norton.

Endereço: Rua Alfredo Balena, 189 – Nupad 15º andar – Santa Efigênia.

Telefone: (31) 3409-8940

E-mail: Rocksane.norton@gmail.com

Assinatura do pesquisador responsável _____

COEP-UFMG – Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II – 2º andar – sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP:31270-901

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Telefone: 9409-4592

ANEXO B – Aprovação no Departamento de Pediatria da FM/UFMG

Parecer PED 02/2016



FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / 4º andar
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100



Parecer do Departamento de Pediatria FM/UFMG—Parecer 02/2016

Projeto: **Caracterização bioquímica e molecular das formas graves e parciais da deficiência de biotinidase no Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais: estudo prospectivo de cinco anos**

Interessado: Profª. Rocksane Carvalho Norton

Antecedentes:

Trata-se de projeto de pesquisa desenvolvido pela equipe do NUPAD no âmbito do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG). O estudo pretende realizar o estudo molecular do gene biotinidase (BTD) nos pacientes triados pelo PTN-MG no período de 2013 a 2018 que tiveram teste enzimático em soro confirmado para deficiência de biotinidase parcial ou profunda. Com este estudo espera-se identificar as mutações presentes na população estudada, estabelecer a prevalência destas mutações em Minas Gerais, correlacionar os resultados bioquímicos com os moleculares de forma a se confirmarem os valores do ponto de corte adotados no PTN-MG.

O cronograma de atividades está bem detalhado.

O projeto não envolve conflitos de natureza ética.

Os resultados do projeto em tela podem contribuir para indicação mais segura do tratamento e melhor compreensão da correlação fenótipo-genótipo nos portadores de deficiência de biotinidase.


Parecer:

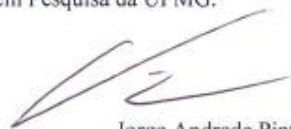
O meu parecer, s.m.j., é pela aprovação do projeto pelo Departamento de Pediatria para que prossigam as tramitações junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2016.

ROVADO EM REUNIÃO DE
UNIDADE DEPARTAMENTAL

26.02.2016


Profª. Cláudia Regina Lindgren
Chefe do Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG



Jorge Andrade Pinto
Professor Titular,
Departamento de Pediatria

ANEXO C – Aprovação no COEP da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE 55189816.4.0000.5149

Interessado(a): Profa. Rocksane de Carvalho Norton
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de maio de 2016, o projeto de pesquisa intitulado **"Caracterização bioquímica e molecular das formas graves e parciais da deficiência de biotinidase no Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais: estudo prospectivo de cinco anos"** 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 através da Plataforma Brasil.

Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz

Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO D – Protocolos de extração de DNA

Preparação da solução de Chelex a 5%

- Adicionar 5 gramas da resina Chelex (BioRad) em 100 mL de água ultrapura.
- Colocar uma barra magnética no frasco contendo a solução

Obs: ao pipetar o reagente Chelex, o frasco de solução deve permanecer em cima do agitador magnético de forma que as partículas da resina fiquem homogêneas na solução.

Extração de DNA em amostras de sangue em papel filtro FTA ou Papel filtro triagem

- Adicionar 1,5mL de água bidestilada em nos tubos de reação de 1,5 mL previamente identificados com os códigos das amostras;
- Com um picotador de 5mm, fazer o picote na amostra de sangue, selecionar a região mais central onde o sangue tenha transpassado o papel. Colocar o picote dentro do tubo correspondente;
- Colocar os tubos de reação em agitador orbital em velocidade lenta por 40 minutos para que ocorra a hemólise.
- Dar vórtex nos tubos por 10 segundos;
- Colocar os tubos na centrifuga a 14.000 rpm por 6 minutos
- Retirar o sobrenadante deixando aproximadamente 20 µl do mesmo;
- Adicionar 150 µL da solução de Chelex a 5 %;
- Dar vórtex nos tubos por 10 segundos;
- Colocar os tubos em banho maria a 56°C por 20 minutos;
- Dar vórtex nos tubos por 10 segundos;
- Colocar os tubos em banho seco a 100°C por 8 minutos;
- Dar vórtex nos tubos por 10 segundos;
- Armazenar o DNA entre em geladeira até o momento de uso.

Extração de DNA em amostras de sangue total (EDTA)

- Adicionar 1,5mL de água bidestilada em nos tubos de reação de 1,5 mL previamente identificados com os códigos das amostras;
 - Pipetar 200 µL de sangue no tubo correspondente
 - Colocar os tubos de reação em agitador orbital em velocidade lenta por 30 minutos para que ocorra a hemólise.
 - Dar vórtex nos tubos por 10 segundos;
 - Colocar os tubos na centrifuga a 14.000 rpm por 4 minutos
 - Retirar todo o sobrenadante, tomar cuidado com o sedimento no fundo do tubo;
 - Adicionar 200 µL da solução de Chelex a 5 %;
 - Dar vórtex nos tubos por 10 segundos;
 - Colocar os tubos em banho maria a 56°C por 20 minutos;
 - Dar vórtex nos tubos por 10 segundos;
 - Colocar os tubos em banho seco a 100°C por 8 minutos;
 - Dar vórtex nos tubos por 10 segundos;
- Armazenar o DNA em geladeira até o momento de uso.

ANEXO E: Tabela com dados dos 136 pacientes analisados no estudo

| ID | Pacientes | Data Nascimento | Classificação | Resultados Atividade enzimática (nmol/mim/mL) | | | | | | Media das dosagens | Genótipo | |
|-----|-----------|-----------------|---------------|---|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------|-------------|--------------|
| | | | | Exame 1 | Exame 2 | Exame 3 | Exame 4 | Exame 5 | Exame 6 | | Alelo 1 | Alelo 2 |
| 40 | BTD-416 | 12-Aug-16 | Borderline | 2,3 | 2,2 | | | | | 2,3 | D444H | D543E |
| 60 | BTD-448 | 11-Jan-17 | Borderline | 2,2 | 2,8 | 2,2 | | | | 2,4 | D444H | c.310-15delT |
| 79 | BTD-527 | 11-Nov-17 | Borderline | 2,2 | | | | | | 2,2 | D444H | ? |
| 24 | BTD-684 | 26-Feb-18 | Borderline | 2,2 | 2,2 | | | | | 2,2 | D444H | D444H |
| 38 | BTD-308 | 27-Apr-15 | Borderline | 2,3 | 2,2 | | | | | 2,3 | D444H | F361V |
| 78 | BTD-323 | 2-Sep-15 | Borderline | 2,3 | 2,2 | 2,5 | | | | 2,3 | D444H | D543E |
| 39 | BTD-404 | 17-May-16 | Parcial | 1,8 | 0,9 | | | | | 1,4 | D444H | T532M |
| 41 | BTD-233 | 23-Jan-15 | Parcial | 1,7 | 1,5 | 1,3 | | | | 1,5 | D444H | D444H/A171T |
| 33 | BTD-403 | 18-May-16 | Parcial | 1,7 | 1,4 | 1,6 | | | | 1,6 | D444H | R538H |
| 81 | BTD-236 | 27-Jan-15 | Parcial | 2,1 | 1,6 | 2,1 | 1,2 | 1,6 | | 1,7 | D444H | G114V |
| 93 | BTD-245 | 20-Feb-15 | Parcial | 1,7 | 1,4 | 1,8 | 1,3 | 1,6 | 1,7 | 1,6 | D444H | C33Ffs*36 |
| 42 | BTD-216 | 19-Dec-14 | Parcial | 1,1 | 2,0 | 1,6 | | | | 1,6 | D444H | D252G |
| 85 | BTD-439 | 16-Dec-16 | Parcial | 1,8 | 2,1 | | | | | 2,0 | D444H | F361V |
| 37 | BTD-246 | 18-Feb-15 | Parcial | 2,0 | 1,8 | 1,7 | 1,5 | | | 1,8 | D444H | Q456H |
| 110 | BTD-226 | 3-Jan-15 | Parcial | 1,8 | 1,6 | 2,0 | 1,3 | 1,8 | | 1,7 | S311T | Y438X |
| 74 | BTD-487 | 7-Jul-17 | Parcial | 0,8 | 0,7 | | | | | 0,8 | V199M/C471C | R122G |
| 112 | BTD-397 | 14-Apr-16 | Parcial | 1,3 | 2,1 | | | | | 1,7 | D444H | c.310-15delT |
| 117 | BTD-498 | 6-Sep-17 | Parcial | 1,8 | 1,2 | | | | | 1,5 | D444H | A534V |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|---------|-----|-----|-----|--|--|--|-----|--------------|--------------------|
| 116 | BTD-514 | 1-Nov-17 | Parcial | 1,2 | 1,4 | | | | | 1,3 | D444H | H485Q |
| 56 | BTD-330 | 13-Oct-15 | Parcial | 1,5 | 0,9 | 1,6 | | | | 1,3 | D444H | D444H/A171T |
| 91 | BTD-431 | 8-Nov-16 | Parcial | 1,0 | 1,7 | | | | | 1,4 | D444H | D444H/A171T |
| 44 | BTD-421 | 6-Sep-16 | Parcial | 1,9 | 1,9 | | | | | 1,9 | D444H | L40P |
| 115 | BTD-458 | 15-Mar-17 | Parcial | 1,9 | 2,0 | 2,0 | | | | 2,0 | D444H | C33Ffs*36 |
| 88 | BTD-405 | 23-May-16 | Parcial | 1,7 | | | | | | 1,7 | D444H | D444H/A171T |
| 76 | BTD-468 | 24-Apr-17 | Parcial | 2,1 | 1,6 | | | | | 1,9 | D444H | Q456H |
| 100 | BTD-394 | 27-Mar-16 | Parcial | 0,8 | 1,0 | | | | | 0,9 | c.310-15delT | D444H/A171T |
| 36 | BTD-413 | 30-Jul-16 | Parcial | 1,6 | 1,5 | 1,2 | | | | 1,4 | D444H | ? |
| 80 | BTD-419 | 26-Aug-16 | Parcial | 1,0 | 1,6 | 1,6 | | | | 1,4 | D543E | D543E |
| 99 | BTD-429 | 26-Oct-16 | Parcial | 1,9 | 1,3 | | | | | 1,6 | D444H | D444H/A171T |
| 106 | BTD-469 | 3-May-17 | Parcial | 2,1 | 2,0 | 2,0 | | | | 2,0 | D444H | D444H/A171T |
| 72 | BTD-424 | 21-Sep-16 | Parcial | 1,8 | 1,9 | | | | | 1,9 | D444H | D543E |
| 83 | BTD-464 | 4-Apr-17 | Parcial | 1,5 | 1,0 | | | | | 1,3 | D444H | D444H |
| 92 | BTD-466 | 3-Apr-17 | Parcial | 1,1 | 0,7 | 1,9 | | | | 1,2 | c.310-15delT | K286Kfs*22 |
| 87 | BTD-461 | 13-Mar-17 | Parcial | 1,5 | 1,9 | 1,8 | | | | 1,7 | D444H | D543E |
| 35 | BTD-477 | 28-May-17 | Parcial | 1,9 | 1,6 | | | | | 1,8 | D444H | C33Ffs*36 |
| 43 | BTD-595 | 31-Dec-17 | Parcial | 1,8 | 1,3 | | | | | 1,6 | D444H | L40P |
| 90 | BTD-318 | 6-Sep-15 | Parcial | 1,6 | | | | | | 1,6 | D444H | P497S/Y428Y |
| 107 | BTD-490 | 22-Jul-17 | Parcial | 1,4 | 1,4 | | | | | 1,4 | D444H | c.310-15delT/R211L |
| 89 | BTD-317 | 25-Jul-15 | Parcial | 2,0 | 1,6 | 1,3 | | | | 1,6 | D444H | Y438X |
| 126 | BTD-311 | 26-Jun-15 | Parcial | 1,9 | 2,1 | | | | | 2,0 | D444H | A534V |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|---------|-----|-----|-----|--|--|--|-----|-------------|--------------|
| 103 | BTD-388 | 26-Feb-16 | Parcial | 1,7 | 1,6 | | | | | 1,7 | D444H | D444H/A171T |
| 114 | BTD-339 | 16-Oct-15 | Parcial | 1,6 | 0,9 | | | | | 1,3 | D444H | Q456H |
| 105 | BTD-455 | 24-Feb-17 | Parcial | 0,8 | 0,8 | | | | | 0,8 | V199M/C471C | D252G |
| 53 | BTD-412 | 30-Jun-16 | Parcial | 1,7 | 1,4 | | | | | 1,6 | D444H | D444H/R157H |
| 102 | BTD-222 | 8-Dec-14 | Parcial | 1,7 | 1,5 | | | | | 1,6 | D444H | H485Q |
| 108 | BTD-519 | 15-Nov-17 | Parcial | 2,0 | 2,1 | | | | | 2,1 | D444H | H485Q |
| 124 | BTD-319 | 1-Sep-15 | Parcial | 2,0 | 2,1 | | | | | 2,1 | D444H | c.310-15delT |
| 51 | BTD-399 | 12-Apr-16 | Parcial | 2,1 | 1,6 | | | | | 1,9 | D444H | D543E |
| 111 | BTD-414 | 2-Aug-16 | Parcial | 1,2 | 1,2 | | | | | 1,2 | D444H | G114V |
| 50 | BTD-351 | 24-Nov-15 | Parcial | 1,6 | 2,0 | 2,2 | | | | 1,9 | D444H | V199M/C471C |
| 48 | BTD-554 | 28-Nov-17 | Parcial | 1,3 | 1,2 | | | | | 1,3 | F361V | H485Q |
| 71 | BTD-523 | 5-Nov-17 | Parcial | 1,1 | 0,9 | | | | | 1,0 | D444H | D252G |
| 86 | BTD-402 | 16-Apr-16 | Parcial | 1,7 | 1,8 | | | | | 1,8 | D444H | D444H/A171T |
| 58 | BTD-594 | 14-Dec-17 | Parcial | 1,5 | 1,7 | 1,0 | | | | 1,4 | D444H | D444H/A171T |
| 62 | BTD-442 | 28-Nov-16 | Parcial | 1,7 | 1,6 | 2,1 | | | | 1,8 | D444H | D444H/A171T |
| 98 | BTD-302 | 31-May-15 | Parcial | 1,9 | 1,9 | 1,6 | | | | 1,8 | D444H | D444H/A171T |
| 113 | BTD-363 | 2-Dec-15 | Parcial | 1,9 | 1,2 | | | | | 1,6 | D444H | D444H/A171T |
| 82 | BTD-614 | 4-Jan-18 | Parcial | 1,6 | 1,6 | | | | | 1,6 | D444H | D444H |
| 95 | BTD-723 | 2-May-18 | Parcial | 1,9 | 1,6 | | | | | 1,8 | D444H | Q456H |
| 34 | BTD-396 | 25-Feb-16 | Parcial | 1,1 | 2,0 | | | | | 1,6 | D444H | G114V |
| 118 | BTD-671 | 19-Feb-18 | Parcial | 1,5 | 1,3 | | | | | 1,4 | D444H | ? |
| 104 | BTD-707 | 5-Apr-18 | Parcial | 1,9 | 2,1 | | | | | 2,0 | D444H | ? |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|--------------|
| 96 | BTD-368 | 9-Dec-15 | Parcial | 1,6 | 2,0 | | | | | 1,8 | D444H | V457A |
| 52 | BTD-386 | 17-Jan-16 | Parcial | 1,8 | 2,0 | | | | | 1,9 | D444H | P497S/Y428Y |
| 75 | BTD-342 | 27-Sep-15 | Parcial | 1,1 | 1,2 | 1,1 | | | | 1,1 | V199M/C471C | H485Q |
| 84 | BTD-128 | 23-Apr-14 | Parcial | 1,9 | 1,3 | 1,7 | 1,7 | 1,3 | | 1,6 | D444H | Y93C |
| 61 | BTD-176 | 18-Aug-14 | Parcial | 1,8 | 1,1 | 1,8 | 2,1 | | | 1,7 | D444H | Q456H |
| 122 | BTD-76 | 17-Feb-14 | Parcial | 1,5 | 1,7 | 2,1 | | | | 1,8 | D444H | Y438X |
| 119 | BTD-149 | 5-Jul-14 | Parcial | 1,4 | 1,5 | 1,0 | | | | 1,3 | D444H | D444H/A171T |
| 120 | BTD-92 | 25-Feb-14 | Parcial | 1,5 | 1,5 | 1,6 | | | | 1,5 | D444H | D444H/A171T |
| 125 | BTD-28 | 9-Jan-14 | Parcial | 1,2 | | | | | | 1,2 | D444H | Y438X |
| 128 | BTD-46 | 22-Jan-14 | Parcial | 0,8 | 1,3 | 1,5 | | | | 1,2 | D444H | D444H/A171T |
| 129 | BTD-120 | 26-Mar-14 | Parcial | 1,0 | 0,3 | 1,2 | 1,3 | | | 1,0 | D543E | D543E |
| 77 | BTD-154 | 8-Jul-14 | Parcial | 1,6 | 1,6 | 1,8 | 1,8 | | | 1,7 | D444H | C33Ffs*36 |
| 45 | BTD-125 | 3-Apr-14 | Parcial | 1,3 | 1,0 | 1,1 | 1,4 | 0,9 | | 1,1 | D444H | A281V |
| 109 | BTD-126 | 24-Mar-14 | Parcial | 2,1 | 2,0 | 1,5 | | | | 1,9 | D444H | D543E |
| 55 | BTD-147 | 29-May-14 | Parcial | 1,7 | 1,9 | 1,6 | 1,6 | | | 1,7 | D444H | C33Ffs*36 |
| 97 | BTD-145 | 20-May-14 | Parcial | 2,0 | 1,9 | | | | | 2,0 | D444H | G114V |
| 57 | BTD-67 | 24-Dec-13 | Parcial | 1,0 | | | | | | 1,0 | F361V | F361V |
| 123 | BTD-86 | 14-Dec-13 | Parcial | 1,3 | 1,6 | 2,0 | | | | 1,6 | D444H | D444H/W409fs |
| 63 | BTD-459 | 25-Feb-16 | Parcial | 1,7 | 1,7 | | | | | 1,7 | D444H | G114V |
| 94 | BTD-37 | 10-Jun-13 | Parcial | 1,5 | 1,2 | 1,0 | 1,7 | 1,7 | | 1,4 | D444H | P497S/Y428Y |
| 49 | BTD-106 | 3-Jun-13 | Parcial | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | | | 1,2 | V199M/C471C | V199M/C471C |
| 46 | BTD-35 | 17-Aug-13 | Parcial | 2,4 | 0,7 | 1,6 | 1,1 | 1,3 | 1,5 | 1,4 | F361V | F361V |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|---------------------|-----|-----|-----|-----|--|--|-----|-------|--------------|
| 121 | BTD-243 | 13-Feb-15 | Parcial/Borderline | 2,2 | 1,4 | 0,9 | | | | 1,5 | D444H | D444H/A171T |
| 64 | BTD-224 | 20-Dec-14 | Parcial/Borderline | 1,6 | 2,2 | | | | | 1,9 | D444H | D444H/A171T |
| 127 | BTD-465 | 5-Apr-17 | Parcial/Borderline | 2,3 | 1,8 | 1,8 | | | | 2,0 | D444H | R157H |
| 65 | BTD-44 | 21-Jan-14 | Parcial/Borderline | 1,5 | 1,7 | 2,3 | | | | 1,8 | D444H | Q456H |
| 134 | BTD-348 | 17-Nov-15 | Parcial/Sug. Hetero | 1,6 | 2,8 | | | | | 2,2 | D444H | D444H |
| 68 | BTD-406 | 4-Jun-16 | Parcial/Sug. Hetero | 2,1 | 3,4 | | | | | 2,8 | D444H | D444H |
| 135 | BTD-505 | 3-Oct-17 | Parcial/Sug. Hetero | 2,7 | 1,5 | 1,1 | | | | 1,8 | D444H | D444H |
| 73 | BTD-283 | 29-Apr-15 | Parcial/Sug. Hetero | 2,0 | 2,6 | | | | | 2,3 | D444H | H485Q |
| 69 | BTD-504 | 3-Oct-17 | Parcial/Sug. Hetero | 2,4 | 2,0 | 1,6 | | | | 2,0 | D444H | L278I |
| 131 | BTD-400 | 26-Apr-16 | Parcial/Sug. Hetero | 2,2 | 2,1 | 2,2 | 3,5 | | | 2,5 | D444H | P497S/Y428Y |
| 132 | BTD-456 | 6-Mar-17 | Parcial/Sug. Hetero | 1,4 | 2,6 | | | | | 2,0 | D444H | D543E |
| 67 | BTD-438 | 9-Dec-16 | Parcial/Sug. Hetero | 1,7 | 2,8 | 1,7 | 2,2 | | | 2,1 | D444H | D543E |
| 133 | BTD-223 | 15-Dec-14 | Parcial/Sug. Hetero | 2,1 | 3,4 | | | | | 2,8 | D444H | D444H |
| 66 | BTD-280 | 16-Apr-15 | Parcial/Sug. Hetero | 1,6 | 3,9 | | | | | 2,8 | D444H | D444H |
| 70 | BTD-611 | 17-Jan-18 | Parcial/Sug. Hetero | 2,4 | 1,5 | 3,0 | | | | 2,3 | D444H | c.310-15delT |
| 59 | BTD-501 | 5-Sep-17 | Parcial/Sug. Hetero | 1,6 | 1,5 | 4,1 | | | | 2,4 | D444H | L90R |
| 25 | BTD-320 | 31-Aug-15 | Parcial/Sug. Hetero | 2,4 | 1,9 | 2,1 | | | | 2,1 | D444H | D543E |
| 31 | BTD-499 | 31-Aug-17 | Parcial/Sug. Hetero | 2,9 | 1,2 | 3,0 | | | | 2,4 | D444H | D444H |
| 27 | BTD-451 | 24-Jan-17 | Parcial/Sug. Hetero | 1,8 | 2,4 | 1,4 | | | | 1,9 | D444H | A237T |
| 14 | BTD-608 | 7-Jan-18 | Parcial/Sug. Hetero | 1,9 | 2,1 | 2,3 | 3,2 | | | 2,4 | D444H | D444H |
| 18 | BTD-623 | 27-Jan-18 | Parcial/Sug. Hetero | 2,1 | 2,7 | 3,0 | | | | 2,6 | D444H | D444H |
| 29 | BTD-624 | 27-Jan-18 | Parcial/Sug. Hetero | 1,8 | 2,7 | 3,5 | | | | 2,7 | D444H | D444H |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|--------------|
| 16 | BTD-483 | 9-Jun-17 | Parcial/Sug. Hetero | 2,4 | 1,3 | 1,7 | 1,5 | | | 1,7 | D444H | D444H/A171T |
| 47 | BTD-325 | 4-Sep-15 | Parcial/Sug. Hetero | 1,3 | 2,7 | 1,7 | | | | 1,9 | D444H | Q88Rfs*10 |
| 9 | BTD-332 | 7-Oct-15 | Parcial/Sug. Hetero | 2,0 | 2,4 | 2,7 | | | | 2,4 | D444H | D444H |
| 32 | BTD-361 | 17-Nov-15 | Parcial/Sug. Hetero | 1,5 | 2,0 | 3,1 | 2,2 | | | 2,2 | D444H | D444H |
| 4 | BTD-316 | 13-Jul-15 | Parcial/Sug. Hetero | 1,8 | 2,7 | 2,5 | | | | 2,3 | D444H | V199M/C471C |
| 10 | BTD-548 | 17-Nov-17 | Parcial/Sug. Hetero | 2,2 | 1,9 | 2,5 | | | | 2,2 | D444H | c.310-15delT |
| 21 | BTD-367 | 22-Dec-15 | Parcial/Sug. Hetero | 1,9 | 3,0 | | | | | 2,5 | D444H | D444H |
| 136 | BTD-372 | 28-Dec-15 | Parcial/Sug. Hetero | 1,9 | 2,7 | 2,5 | | | | 2,4 | D444H | D444H |
| 30 | BTD-731 | 25-May-18 | Parcial/Sug. Hetero | 1,9 | 2,6 | | | | | 2,3 | D444H | D444H |
| 22 | BTD-382 | 12-Jan-16 | Parcial/Sug. Hetero | 1,6 | 2,1 | 2,4 | | | | 2,0 | D444H | D444H |
| 11 | BTD-146 | 30-Jun-14 | Parcial/Sug. Hetero | 2,1 | 1,9 | 3,6 | | | | 2,5 | D444H | V199M/C471C |
| 23 | BTD-107 | 9-Mar-14 | Parcial/Sug. Hetero | 1,9 | 1,7 | 2,4 | | | | 2,0 | D444H | C33Ffs*36 |
| 28 | BTD-177 | 14-Aug-14 | Parcial/Sug. Hetero | 2,8 | 3,1 | 2,0 | | | | 2,6 | D444H | D444H |
| 26 | BTD-739 | 19-Apr-18 | Parcial/Sug. Hetero | 2,0 | 2,5 | | | | | 2,3 | D444H | c.310-15delT |
| 3 | BTD-47 | 15-Jan-14 | Parcial/Sug. Hetero | 1,9 | 2,4 | 1,8 | | | | 2,0 | D444H | D543E |
| 130 | BTD-25 | 4-Dec-13 | Parcial/Sug. Hetero | 1,5 | 1,7 | 2,9 | 2,9 | 2,1 | 2,1 | 2,2 | D444H | H485Q |
| 13 | BTD-669 | 29-Jan-18 | Parcial/Sug. Hetero | 2,1 | 3,1 | | | | | 2,6 | D444H | D444H |
| 15 | BTD-55 | 26-Nov-13 | Parcial/Sug. Hetero | 1,4 | 2,4 | 2,4 | | | | 2,1 | D444H | D543E |
| 12 | BTD-19 | 19-Oct-13 | Parcial/Sug. Hetero | 2,0 | 2,5 | 2,8 | | | | 2,4 | D444H | H485Q |
| 1 | BTD-23 | 6-Sep-13 | Parcial/Sug. Hetero | 2,0 | 2,3 | 2,5 | 1,9 | | | 2,2 | D444H | D543E |
| 2 | BTD-36 | 10-Jul-13 | Parcial/Sug. Hetero | 2,5 | 3,0 | 1,5 | | | | 2,3 | D444H | D444H |
| 6 | BTD-38 | 30-Jun-13 | Parcial/Sug. Hetero | 2,4 | 3,0 | 2,0 | | | | 2,5 | D444H | D444H |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----|---------|-----------|---------------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|------------|-------------|-------------|
| 8 | BTD-110 | 13-Jun-13 | Parcial/Sug. Hetero | 2,1 | 3,0 | | | | | 2,6 | D444H | D444H |
| 101 | BTD-115 | 13-Jun-13 | Parcial/Sug. Hetero | 2,2 | 2,0 | 2,3 | 2,6 | | | 2,3 | D444H | D543E |
| 7 | BTD-127 | 14-Apr-14 | Profundo | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | | 0,1 | G114V | G114V |
| 19 | BTD-415 | 19-Aug-16 | Profundo | 0,1 | 0,2 | | | | | 0,2 | D444H/A171T | D444H/A171T |
| 20 | BTD-352 | 13-Nov-15 | Profundo | 0,3 | 0,6 | | | | | 0,5 | R211S | T532M |
| 17 | BTD-289 | 29-Apr-15 | Profundo | 0,3 | 0,3 | | | | | 0,3 | A534V | A534V |
| 5 | BTD-452 | 27-Jan-17 | Profundo | 0,6 | 0,8 | | | | | 0,7 | Y494C | D444H/A171T |
| 54 | BTD-370 | 18-Dec-15 | Profundo | 0,7 | 0,3 | 0,3 | | | | 0,4 | R538C | C33Ffs*36 |