

ANNA LECTÍCIA RIBEIRO PINTO

**DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE: ESTUDO DA  
PREVALÊNCIA EM RECÉM-NASCIDOS NO  
ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação - Mestrado em Pediatria da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Pediatria.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Kimiyo Mogami Raymond

CURITIBA  
1995

*Aos meus pais, Octávio e Yayá*  
*Ao Álvaro, meu cúmplice na aventura de viver*

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Kimiyo Mogami Raymond, pela confiança demonstrada ao me indicar o tema e dedicação carinhosa na orientação do trabalho; pela amizade e exemplo de vida que permanecerão.

Ao Dr. Isac Bruck, pela amizade e transmissão abnegada de conhecimento ao longo do curso; pela co-orientação firme e decisiva.

Ao Dr. Israil Cat, coordenador do Curso de Mestrado, à época do meu ingresso.

À Sra. Claudete Hilling, presidente da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE), pelo incentivo constante.

Dr. Ehrenfried O. Wittig, diretor do Centro de Pesquisa da FEPE, por ter acreditado no projeto.

Dra. Vivian Shih, professora de Pediatria e Neurologia da Havard Medical School, por ter possibilitado o uso da técnica e a realização dos exames suspeitos.

Dra. Mousseline T. Domingues, coordenadora do Centro de Pesquisa da FEPE, pela amizade e participação em todas as etapas da pesquisa.

Dr. Sérgio A. Antoniuk, pela leitura atenta e orientações na redação do trabalho.

À professora Martha Garcia Sanchez, aos professores Luiz Gonzaga Caleffe e Sueli Giolo Ruiz, à Bioquímica Siumara Túlio e Dr. Salmo Raskin, pela generosidade com que me repassaram conhecimentos de suas respectivas especialidades.

Luís G. Póvoa, pela indicação de Referências Bibliográficas; Karin Lydia Kohlscheen, pelas referências e traduções dos textos em alemão.

Antônia Schwinden, pela preparação dos originais e Léia Rachel Castellar, pela formatação do trabalho.

Nair, Rosane, Ramona, Ivonete, Adriana, Paulo, Osny, Eugênia, Aurélio e Marcelo pelo carinho e amizade com que me trataram no Centro de Pesquisa da FEPE.

Às secretárias Lucinda, Bernadete, Dirce, Emília e Cláudia, do Departamento de Pediatria e em especial à Clara Lara de Freitas pela atenção e carinho dispensados.

Júlio Amaro de Sá Koneski, pela amizade e companheirismo nos dois anos de mestrado.

Léo R. Honicke e Adilson Dalastta, pela compreensão dos momentos ausentes.

Anor e Leci, pelo carinho e incentivo.

Aos irmãos Angela, Alba e Octavinho.

Aos sobrinhos Yuri, Felipe e Marcos André.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	5
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	6
3.1 BIOTINA .....	6
3.2 BIOTINIDASE.....	13
3.3 "SCREENING" PARA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE.....	23
<b>4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	28
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA .....	28
4.2 MATERIAL E MÉTODO .....	28
4.2.1 Colheita do Material.....	28
4.2.2 Teste Semiquantitativo Colorimétrico para Atividade de Biotinidase.....	29
4.2.3 Reconvocação .....	34
4.2.4 Teste Quantitativo para Deficiência de Biotinidase.....	34
4.3 REFERENCIAL DOS VALORES NORMAIS DOS ADULTOS.....	37
4.4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA .....	38
4.4.1 Aspectos Técnicos.....	38
4.4.2 Aspecto Social.....	38
4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	38
<b>5 RESULTADOS</b> .....	40
5.1 PREVALÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE.....	40

5.2	DESCRIÇÃO DOS CASOS ENCONTRADOS.....	41
5.3	CÁLCULO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE PARA O TESTE SEMIQUANTITATIVO .....	42
5.4	CUSTO DO PROGRAMA.....	43
5.5	CUSTO DO TRATAMENTO .....	43
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	44
7	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	51
7.1	CONCLUSÕES.....	51
7.2	SUGESTÕES .....	52
	<b>ANEXO 1 - MAPA DO ESTADO DO PARANÁ COM AS INSTI- TUIÇÕES CONVENIADAS ASSINALADAS .....</b>	53
	<b>ANEXO 2 - FLUXOGRAMA .....</b>	55
	<b>ANEXO 3 - CARTÃO DE COLETA DE EXAME .....</b>	57
	<b>ANEXO 4 - PLACA DEMONSTRATIVA DE EXAMES NORMAIS.....</b>	59
	<b>ANEXO 5 - CURVA DE CONCENTRAÇÃO DO PABA .....</b>	61
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	63

## LISTA DE TABELAS

1 - Valores da atividade de biotinidase nos casos identificados .....	41
2 - Número de falso-positivos, falso-negativos e casos identificados .....	42
3 - Distribuição dos custos do programa.....	43

## LISTA DE FIGURAS

1 - Estrutura Molecular da Biotina .....	6
2 - Esquema das vias Metabólicas .....	8
3 - Ciclo da Biotina.....	10

## RESUMO

A deficiência de biotinidase é uma desordem hereditária do metabolismo da biotina. Este defeito enzimático preenche os principais critérios para que possa ser considerado seu “screening” no período neonatal: (1) os pacientes afetados não exibem sintomas ao nascimento, (2) a doença deixa sequelas debilitantes, (3) o tratamento é conhecido e (4) previne as conseqüências clínicas da doença.

Com o objetivo de estabelecer a prevalência da deficiência de biotinidase, foram analisados 125.000 recém-nascidos no Estado do Paraná. Os recém-nascidos foram submetidos ao teste semiquantitativo colorimétrico. Foram identificados dois casos de deficiência de biotinidase (1:62.500), sendo um caso de deficiência total (1:125.000) e o outro de deficiência parcial (1:125.000).

O teste em questão não apresentou resultados falso-negativos, e os falso-positivos representaram 0,12% do total. Estes foram definidos como os casos que necessitaram de nova amostra sangüínea, cujo segundo exame foi normal. A principal dificuldade foi a baixa adesão ao trabalho, dos 212 casos suspeitos, 30% não enviaram o segundo cartão.

A especificidade do teste foi calculada em 99,88%.

De acordo com a análise dos dados, considera-se o rastreamento da deficiência de biotinidase efetivo de baixo custo econômico e de inestimável valor na prevenção de complicações irreversíveis da doença, pelo menos nos casos identificados no período neonatal.

## ABSTRACT

Biotinidase deficiency is an inheritable disorder of biotin metabolism. This disorder fulfills major criteria to be considered for newborn screening: (1) the affected children do not show clinical signs in the newborn period, (2) the disease is very disabling, (3) treatment is effective in preventing neurologic sequelae if promptly instituted.

We screened 125.000 infants born in Paraná State to establish the prevalence of biotinidase deficiency. A simple colorimetric procedure was used and detected two infants with biotinidase deficiency (1:62.500), one of them with complete deficiency (1:125.000) and the other with partial deficiency (1:125.000) of the enzyme.

There were no known false-negative test results and 0,12% were false-positive, defined as new blood samples which were negative upon repeat testing. Specificity was 99,88%. We could not obtain repeat blood samples in 63 (30%) suspected cases.

Newborn screening for biotinidase is useful in identifying affected children, inexpensive and allows early intervention, which may prevent irreversible neurological damages.

## 1 INTRODUÇÃO

*Proceder a exames visando ao diagnóstico e terapêutica de anormalidades no metabolismo do recém-nascido, bem como prestar orientação aos pais.*

Lei Federal nº 8069

Nas últimas três décadas o rastreamento de doenças metabólicas no período neonatal passou a ser medida importante de medicina preventiva.

FOLLING em 1934, citado por WIDHALM (1992), descreveu a fenilcetonúria, primeira desordem do metabolismo conhecida com o privilégio de ser tratável. Na época o método existente para sua detecção era o do cloreto férrico em amostra de urina. Esse teste mostrava-se positivo para a doença em fase tardia.

No final da década de 50, o médico americano ROBERT GUTHRIE, cujo campo de pesquisa inicialmente era a oncologia, após o nascimento de seu filho portador de deficiência mental, viu-se estimulado a pesquisar medidas de prevenção das desordens do desenvolvimento. Com o conhecimento de que a fenilcetonúria seria um exemplo de causa prevenível do retardo mental, teve a iniciativa de desenvolver teste viável para detecção e tratamento precoces. Evitava-se, assim, a seqüela neurológica (GUTHRIE, 1992).

Em 1962, detectou-se a primeira criança portadora de fenilcetonúria, entre 800 recém-nascidos triados.

Começaram, então, a ser organizados programas de "screening"\* neonatal, visando reduzir os casos de deficiência mental, causados por deficiências bioquímicas. Desde sua idealização, o "screening" neonatal tem como seu maior objetivo a detecção precoce de desordens que afetem o desenvolvimento do recém-nascido, e que tenha

---

\* A palavra "screening", de origem inglesa, foi usada por não ter significado exato correspondente na língua portuguesa.

tratamento conhecido, permitindo maturação mental e física normais para as crianças (FOX, 1989).

O “screening” para o hipotireoidismo congênito foi introduzido na década de 70. Outras doenças passaram a integrar uma lista de desordens, que teriam algum benefício com relação ao diagnóstico precoce. Nos dias de hoje, alguns programas de “screening” neonatal abrangem doenças metabólicas, genéticas, infecciosas e até neoplásicas (STEVENS et al., 1988).

Do ponto de vista epidemiológico, milhões de recém-nascidos são testados para várias desordens congênitas e hereditárias do metabolismo, por ano no mundo (STEVENS et al., 1988). As desordens pesquisadas variam quanto à prevalência,\* de mais frequentes (1:500 na hiperlipidemia) a mais raras (1:300.000 na homocistinúria). A detecção precoce de doenças pode procurar atingir outros objetivos, como, por exemplo, na infecção pelo HIV (Human Immunodeficiency Virus) auxilia nos estudos epidemiológicos da doença; o “screening” em massa para distrofia muscular de Duchenne é questionável, uma vez que esta desordem não possui até o momento tratamento conhecido (LEVY, 1993).

Para melhor resultado da ação dos programas de detecção precoce de doenças no período neonatal, citam-se como elementos considerados essenciais:

- a) a centralização ou regionalização fortalece o poder administrativo, garantindo efetivo controle sobre a área de atuação;
- b) a existência de legislação capaz de regular os programas;
- c) adequado controle de qualidade dos testes realizados, certificando-se da sua sensibilidade e especificidade;
- d) garantia de acompanhamento especializado, dos casos confirmados;

---

\* É a fração de um grupo que apresenta uma condição clínica em um determinado ponto do tempo. Prevalência período é uma contagem da proporção de casos que estavam presentes em qualquer momento dentro de um período de tempo.

- e) a interligação dos laboratórios com os serviços médicos que farão o acompanhamento dos afetados; e
- f) a seleção das desordens a serem pesquisadas (THERREL et al., 1992).

A Organização Mundial de Saúde em 1968 estabeleceu quais as doenças a serem selecionadas para triagem (THERREL et al., 1992). Os critérios de seleção são:

- a) a doença deve ser freqüente e grave o suficiente para se tornar preocupante em nível de saúde pública;
- b) seus sintomas devem ser conhecidos e inaparentes no período neonatal;
- c) o teste de detecção deve ser viável e com baixos índices de resultados falso-positivo e falso-negativo;
- d) a consequência clínica da doença deve se resolver com o tratamento, e este deve ser acessível;
- e) o método diagnóstico apropriado deve estar disponível para acompanhamento e tratamento das crianças afetadas;
- f) a relação custo/benefício deve ser vantajosa para a sociedade.

A tendência atual é que cada país, ou cada Estado, discuta o seu programa de triagem de doenças no período neonatal, de acordo com suas prioridades, sempre levando em consideração a relação custo/benefício.

No Brasil o "screening" neonatal teve início no Estado de São Paulo, em 1975. Os primeiros exames para fenilcetonúria foram realizados pela APAE desse Estado. Recebeu o nome genérico de "teste do pezinho". Em seguida outros Estados aderiram ao programa, realizando de forma rotineira os testes para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito, e existe lei Federal que regulariza o "screening" neonatal no Brasil (Lei Federal nº 8069).

O Paraná aparece neste panorama no início da década de 80, primeiramente com exame para detecção de fenilcetonúria, seguido pelo exame para o hipotireoidismo congênito. Hoje o programa do Estado destaca-se como um dos mais organizados do Brasil, com cobertura de 90% do Estado, centralizado e gratuito para população, graças a um convênio firmado com o Sistema Único de Saúde (SUS). O

Estado conta ainda com a Lei Estadual nº 8.627, artigo primeiro, que torna obrigatório para todos os recém-nascidos em maternidades atendidas pelo Estado os testes para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito.

A deficiência de biotinidase, descrita pela primeira vez em 1983, preenche todos os principais critérios para inclusão na lista de doenças a serem pesquisadas. Esta desordem causa quadro clínico compatível com o que se conhece como deficiência múltipla de carboxilases. Entre os sintomas estão retardo mental, convulsões e ataxia. HEARD et al. (1984), desenvolveram teste viável de detecção da atividade da enzima, assim como o teste diagnóstico confirmatório da doença. O tratamento é conhecido e consiste na administração de biotina via oral diariamente.

O impacto que causa a triagem neonatal de doenças debilitantes tratáveis em nível de saúde pública, assim como a necessidade de ampliar o número de doenças diagnosticáveis no período neonatal, motivaram a realização deste trabalho.

Contribui, também, o fato de que o teste para deficiência de biotinidase é 10 vezes mais barato para o Estado que a manutenção de um deficiente mental por ano (TIWARY, 1987).

Em relação à questão metodológica, elaborou-se um trabalho prospectivo, orientado a averiguar a prevalência da deficiência de biotinidase na população de recém-nascidos do Estado do Paraná. Mediante tal resultado, poderá ser discutida a validade de instituir o método rotineiramente.

Este estudo descritivo foi realizado no Centro de Pesquisas da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional, que centraliza o "teste do pezinho" no Paraná. Foram triados 125.000 recém-nascidos, por meio do teste semiquantitativo colorimétrico, para deficiência de biotinidase; no período de março a novembro de 1994.

## 2 OBJETIVOS

- a) Estabelecer a prevalência da deficiência de biotinidase na população de recém-nascidos do Estado do Paraná ;
- b) validar o teste de detecção precoce desta desordem metabólica na população paranaense, considerando:
  - a efetividade do método;
  - a relação custo/benefício do método para a sociedade.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

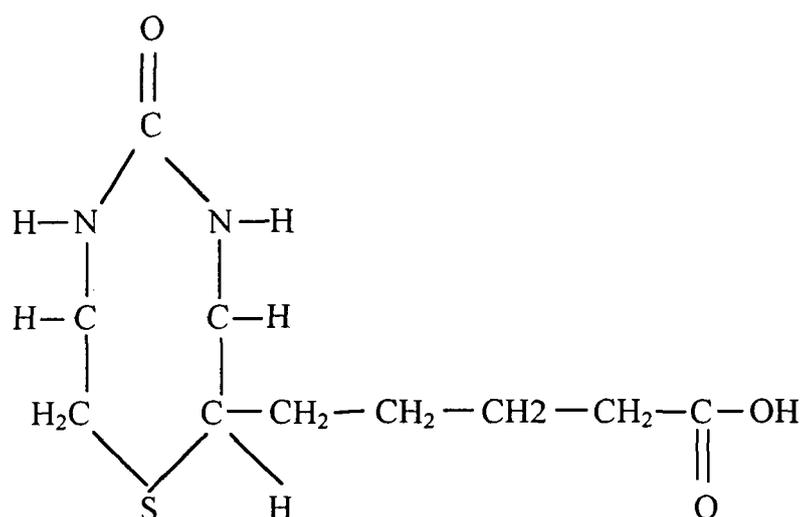
#### 3.1 BIOTINA

A biotina é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, incapaz de ser sintetizada pelo ser humano, sendo elemento obrigatório na dieta. Os conhecimentos a respeito desta vitamina estão evolutivamente ligados aos estudos sobre avidina. Esta é uma proteína presente na clara de ovo e se liga fortemente à biotina, evitando sua absorção no intestino (MAYES et al., 1990).

A biotina foi reconhecida como uma substância que prevenia dermatites, alopecia e alterações neurológicas em animais que se alimentavam exclusivamente de ovo cru. KÖGL, citado por LEHNINGER (1993), isolou a biotina de gema de ovo, em 1936; mais tarde DU VIGNEAUD et al. definiram sua estrutura.

A estrutura molecular da biotina é relativamente simples, composta de dois anéis heterocíclicos (imidazólico e tiofênico fundidos) e uma cadeia de ácido valérico, com grupo carboxílico terminal. O peso molecular é de 244 daltons (fig. 1) (CAMPBELL et al., 1982).

FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DA BIOTINA



A biotina pode ser encontrada nos mais diversos gêneros alimentícios, porém sua concentração absoluta, mesmo nas principais fontes, é baixa. As fontes alimentares mais ricas em biotina são: gema de ovo, rim e fígado (WOLF et al., 1994).

A microflora intestinal parece ter importante contribuição na síntese de biotina. Existem fortes evidências a favor desta teoria, tais como o fato de haver excreção de biotina nas fezes e urina em concentrações que excedem as da dieta. A relevância da síntese intestinal da biotina permanece como alvo de pesquisa (WOLF et al., 1994).

A absorção intestinal da biotina não está totalmente elucidada no ser humano. Existem modelos experimentais em roedores indicando que a biotina livre é absorvida por difusão passiva. Assim como não se conhece o mecanismo da absorção, também é desconhecido o transporte e distribuição desse cofator\* no organismo humano. Até hoje não foi isolada nenhuma proteína específica com a função de transportar a biotina no plasma. Especulou-se sobre várias delas, inclusive a biotinidase, mas é questão que permanece (WOLF et al., 1994).

A biotina tem a função de ativação de enzimas, ou seja, é uma coenzima com propriedade de transportar grupos carboxílicos (COOH), importantes nas reações de carboxilação. As enzimas biotina-dependentes recebem o nome genérico de carboxilases. As carboxilases são sintetizadas no organismo humano em forma inativa, e neste momento recebem o nome de apocarboxilases. Para se tornarem enzimaticamente ativas, necessitam de ligação covalente com a biotina. Esta ligação se faz entre um grupamento carboxílico e um grupo amino de um resíduo de lisina, existente no sítio de ativação da enzima. Na forma ativa, estas são conhecidas como holocarboxilases (NYHAN, 1987).

As carboxilases são quatro (NYHAN, 1987):

---

\* Substância orgânica ou inorgânica de peso molecular pequeno, estável ao calor, necessária para a ação de uma enzima.

- a) Acetil-CoA\* (ACC) carboxilase que catalisa a conversão de acetil-CoA em malonil-CoA, que é passo fundamental na síntese de ácidos graxos e alongamento da cadeia de triglicerídeos; portanto atua na lipogênese. Esta reação se processa no citosol;
- b) Piruvato carboxilase (PC) que promove a conversão de piruvato em oxalacetato, seguindo-se naturalmente ao processo de gliconeogênese. Esta reação, assim como as que serão descritas, ocorrem no interior das mitocôndrias;
- c) Propionil-CoA carboxilase (PCC) que está relacionada à síntese de metilmalonil-CoA, sendo, então, convertida a succinil-CoA, que promove via obrigatória para o catabolismo de quatro aminoácidos essenciais: isoleucina, treonina, valina e metionina;
- d)  $\beta$ -Metilcrotonil-CoA carboxilase ( $\beta$ MCC) que tem atuação essencial no catabolismo da leucina.

A biotina está, portanto, envolvida nos processos de lipogênese, gliconeogênese e degradação de aminoácidos, como é demonstrado pelas vias metabólicas esquematizadas abaixo:

## FIGURA 2 - ESQUEMA DAS VIAS METABÓLICAS

---

\* Coenzima de ácido pantotênico que funciona como um grupo transportador de acil em certas reações enzimáticas.

A "biotinylation" (WOLF et al., 1994) das apocarboxilases requer etapas parciais, primeiramente a ativação da biotina por meio de ATP (Adenosine Triphosphate), que resulta na formação de um composto intermediário denominado biotinil adenilato. Este composto se liga às apoenzimas, transformando-as em carboxilases enzimaticamente ativas. Essas duas reações parciais são catalisadas pela enzima holocarboxilase sintetase.

A holocarboxilase sintetase é uma enzima intensamente específica para biotina; catalisa tanto as reações de ativação que se processam no citosol quanto as reações nas mitocôndrias.

A biotina permanece ligada às carboxilases até ocorrer o fenômeno da regulação, quando a enzima inicia seu processo de desativação e degradação. Esses fenômenos ocorrem de acordo com o processo de renovação normal de qualquer célula.

A degradação protéica se dá pela ação do sistema autofágico lisossomal celular, liberando a porção não-protéica que no caso é a biotina ligada ao resíduo de lisina. Este composto intermediário recebe o nome de biocitina ou biotinil-lisina.

O passo seguinte é o rompimento da ligação biotina e resíduo de lisina, produzindo biotina livre. A enzima responsável por este rompimento é a biotinidase. A biotinidase também é responsável por tornar livre a biotina da dieta, muitas vezes ligada à proteína (WOLF et al., 1994).

A seqüência destes processos pode ser conferida no ciclo da biotina demonstrado na figura 3.

### FIGURA 3 - CICLO DA BIOTINA

As desordens no metabolismo da biotina acontecem rompendo a harmonia deste ciclo, ou por meio da deficiência da holocarboxilase sintetase ou da biotinidase. Como é citado na literatura, a carência primária de biotina é muito rara, isto porque as necessidades diárias são baixas e, mesmo na ausência de ingesta, há produção intestinal suficiente (MAYES et al., 1990).

A determinação da biotina sérica no diagnóstico dessas desordens encontra obstáculo no fato de que todos os métodos desenvolvidos com tal finalidade apresentam alguma limitação. Alguns métodos microbiológicos falham em distinguir a biotina da biocitina (WOLF et al., 1994).

As deficiências enzimáticas de caráter hereditário, quer da holocarboxilase sintetase, quer da biotinidase, levam a uma condição clínica e bioquímica conhecida como deficiência múltipla das carboxilases (NYHAN, 1987).

Os primeiros estudos sobre esta desordem metabólica partiram de um caso descrito em 1971 (COMPERTZ et al., 1971, citado por NYHAN, 1988 ). O paciente em questão apresentava quadro metabólico que levou os autores a considerá-lo desordem no metabolismo da leucina. O exame dos ácidos orgânicos na urina exibia

excesso de ácido 3-hidroxiisovalérico e 3-metilcrotonilglicina. Foi primeiramente descrito como  $\beta$ -metilcrotonilglicinúria.

Os anos que se seguiram fortaleceram o interesse pela continuidade das pesquisas a respeito destes distúrbios bioquímicos, assim como da causa primária. Dez anos mais tarde, BURRI et al. (1981), citado por NYHAN (1988), atribuíram os efeitos metabólicos à deficiência de holocarboxilase sintetase.

Como foi mencionado anteriormente, a holocarboxilase sintetase é uma enzima fundamental no ciclo da biotina, pois sua função é catalisar as etapas parciais de ligação da biotina com as apocarboxilases, ativando-as (WOLF et al., 1994).

Os sintomas pertinentes a essa deficiência geralmente aparecem nos primeiros dias de vida, podendo variar de horas de vida até oito meses; quinze meses foi a idade mais avançada de início do quadro, descrita na literatura (WOLF et al., 1994). A forma neonatal da deficiência múltipla das carboxilases passou a ser atribuída à deficiência de holocarboxilase sintetase, ficando a biotinidase responsável pela forma tardia ou juvenil da doença.

O quadro clínico da deficiência da holocarboxilase sintetase é considerado grave e agudo, caracterizado por vômitos freqüentes, muitas vezes impedindo o paciente de se alimentar; respiração rápida e profunda, podendo evoluir para apnéia que geralmente culmina em óbito, e letargia progressiva, que se não for tratada leva o paciente ao coma. Se o paciente sobrevive a este quadro, evolui com déficit pondero-estatural (NYHAN, 1987).

Entre os sintomas neurológicos da doença encontram-se hipotonia, atraso do desenvolvimento psicomotor (DPM) e convulsões refratárias aos anticonvulsivantes normalmente usados. Nos exames de neuroimagem, como tomografia computadorizada de crânio e ressonância nuclear magnética, pode ser evidenciada hipodensidade da substância branca cortical, sugerindo hipomielinização (NYHAN, 1987; NYHAN, 1988; WOLF et al., 1994).

Em comum com os outros quadros de desordem do metabolismo da biotina, estão as dermatites, descritas como erupções eritematosas descamativas que muitas

vezes complicam com quadro de superinfecção por monília. As complicações infecciosas nestes distúrbios são explicadas por alterações imunológicas. Observou-se diminuição do número das células T, assim como dos leucócitos polimorfonucleares e plaquetas secundária aos efeitos tóxicos dos ácidos orgânicos (NYHAN, 1988).

Os achados bioquímicos são hiperamonemia, cetose maciça e lactiacidemia.

O padrão de ácidos orgânicos na urina é característico de deficiência múltipla das carboxilases. Evidencia-se, portanto, excesso de 3-metilcrotonilglicina, ácido 3-hidroxiisovalérico (ambos representam inabilidade no catabolismo da leucina), ácido metilcítrico e ácido 3-hidroxipropiônico (os dois últimos refletem distúrbios no catabolismo da isoleucina, valina, metionina e treonina). A presença de excesso de ácido 3-hidroxiisovalérico é apontada como a alteração mais comumente encontrada nos casos de deficiência múltipla das carboxilases (NYHAN, 1988).

O defeito enzimático pesquisado tem indicado elevado  $K_m^*$  para biotina, chegando a 60 vezes o normal que é de 8 nmol. Isto explica porque os pacientes portadores de deficiência de holocarboxilase sintetase se beneficiam com biotina via oral. Todos os casos desta deficiência descritos na literatura foram de algum modo sensíveis à biotina (WOLF et al., 1994).

O diagnóstico pré-natal da deficiência de holocarboxilase sintetase é possível mediante dosagem da atividade da enzima em amostras do vilo corial. Entretanto, o método mais usado é o de dosagem de elevadas concentrações de ácido 3-hidroxiisovalérico no líquido amniótico (NYHAN, 1987).

As pesquisas sobre os distúrbios do metabolismo da biotina têm início relativamente recente, permanecendo como motivo de investigação. Entretanto, é sabido que são prontamente responsivos à administração de biotina, sendo assim diante de suspeita clínica deve-se iniciar o tratamento com biotina, mesmo que empiricamente (NYHAN, 1988).

---

\* Constante de Michaelis-Menten. Concentração de substrato específico na qual uma enzima produz metade de sua velocidade máxima.

### 3.2 BIOTINIDASE

A biotinidase é uma enzima hidrolase de fundamental importância no metabolismo da biotina. É uma glicoproteína de produção hepática, com peso molecular estimado em 68.000 daltons. Apresenta estrutura com finalidade específica de hidrólise, sendo seu principal substrato a biocitina (vide fig.2). O Km avaliado para biocitina é de  $7,8\mu\text{M}$  (CHAUHAN, 1986).

A função da biotinidase é tornar livre a biotina ligada covalentemente à proteína ou aos peptídeos. O atividade máxima desta enzima acontece em intervalo de pH de 4,5 a 6,0. O fato de atuar maximamente em pH ácido, direcionou estudos para possível contribuição na absorção intestinal da biotina. Ao que parece, a biotinidase é responsável por liberar a biotina da dieta. Este fato assume importância porque as principais fontes de biotina (carne e cereais) contêm biotina ligada à proteína (vide fig.2) (WOLF et al., 1984)

A deficiência de biotinidase foi descrita pela primeira vez por WOLF et al. em 1983c. Os autores Barry Wolf e Gregory Heard descreveram a entidade clínica, características bioquímicas e método diagnóstico, sendo responsáveis pela maioria das publicações existentes em deficiência de biotinidase. A doença apareceu no cenário das desordens metabólicas com variada expressão fenotípica, caracterizada principalmente por sintomas neurológicos, dermatites e predisposição a infecções (WOLF et al., 1983a).

O primeiro relato na literatura data de 1979 (CHARLES et al., 1979) e foi de um paciente de 10 meses, que apresentava alopecia, dermatite e hipotonia. Como demonstrava padrão metabólico que sugeria desordem no metabolismo da biotina, foi tratado imediatamente com esta vitamina obtendo cura de seus sintomas. Esse paciente apresentou, portanto, regressão do DPM e alopecia responsivos à biotina; os autores descobriram mais tarde (1983) que se tratava de deficiência de biotinidase (TAITZ et al., 1983).

A deficiência de biotinidase é o defeito enzimático primário responsável pelo quadro de deficiência múltipla das carboxilases, na forma tardia ou juvenil. A desordem hereditária por parâmetros clínicos foi considerada autossômica recessiva,

porém estudos recentes (WEISSBECKER et al., 1993) inferem a presença de um gene major codominante - responsável por 70% da expressão da atividade da enzima - associado a efeitos menores poligênicos. A atividade da biotinidase ainda sofre modificações por ação ambiental.

Como mencionado anteriormente, o quadro clínico da deficiência de biotinidase se expressa por fenótipos variados. WOLF et al. (1983a) descreveram seis casos de deficiência total de biotinidase. Os pacientes foram diagnosticados pelos sintomas que exibiam, pois não havia até então um “screening” neonatal para deficiência de biotinidase de rotina. Apesar da diversidade de sintomas, ataxia, convulsão, alopecia e ceratoconjuntivite são considerados patognomônicos da doença (THOENE et al., 1981).

A idade de início dos sintomas de deficiência total de biotinidase varia de uma semana a dois anos, em média cinco meses (WOLF et al., 1994). Não se sabe ao certo porque o paciente se torna sintomático tardiamente, e o que determina a variação dos sintomas. Algumas das possíveis explicações para o aparecimento tardio dos sintomas são:

- a) durante a gestação, o feto pode estocar biotina no fígado, por meio do gradiente transplacentário a seu favor (SCHULZ et al., 1988);
- b) as variações que a biotina sofre no intestino, quer na absorção, quer na produção entérica, pela flora intestinal (WOLF et al. 1983a), e
- c) a presença de biotina livre oferecida na dieta das crianças no primeiro ano de vida, principalmente pelas fórmulas lácteas, supre a carência vitamínica neste período. O leite de vaca contém duas vezes mais biotina que o leite humano (WOLF et al., 1985).

Mesmo tardiamente, os portadores de deficiência de biotinidase apresentam depleção de biotina, ou seja, há perda renal da vitamina (BAUMGARTNER et al., 1984). Não se conhece ainda o mecanismo pelo qual ocorre esta perda, mas a depleção de biotina ajuda na intensidade dos sintomas. Esses indivíduos também apresentam aumento de biocitina urinária (SUORMALA et al., 1990).

Os sintomas neurológicos da deficiência de biotinidase muitas vezes antecedem os cutâneos. Convulsão é apontada como o sintoma isolado mais comum, podendo ser a única manifestação (SALBERT et al., 1993a). Ataxia, atraso no DPM hipo ou hipertonia também são freqüentes (ANGER et al., 1990).

SALBERT et al. (1993a) relataram quadro clínico de 78 crianças portadoras de deficiência de biotinidase sintomáticas. Os autores enfocaram o aspecto da classificação das crises convulsivas que 55% destas crianças apresentaram. O tipo de crise mais comum relatada foi a generalizada tônico-clônica (56%), seguida por espasmos infantis (16%) e crises parciais (5%).

A idade de início dos episódios convulsivos situou-se entre 1 e 6 meses em 65% dos casos, mas variou entre menos de um mês até três anos de idade. Ressalta-se o fato de que as convulsões descritas eram refratárias ao tratamento com anticonvulsivantes comumente usados.

Espasmos infantis, como sintoma inicial desta deficiência enzimática, também foram reportados por outros autores. KALAYCI et al. (1994) relataram dois lactentes, dois e três meses de idade, quando iniciaram quadro compatível com espasmos infantis. Seus eletroencefalogramas não demonstravam padrão de hipsarritmia, mas foram tratados com corticosteróides com resposta parcial à terapêutica. No início das investigações, um dos pacientes não exibia padrão metabólico que sugerisse deficiência múltipla das carboxilases. A suspeita sobreveio clinicamente, pois a criança apresentava alopecia, ceratoconjuntivite e atrofia óptica. O tratamento com biotina via oral foi instituído e prontamente cessaram as crises convulsivas e em dez dias as lesões de pele e cabelo se resolveram. A segunda criança apresentava, além de sintomas cutâneos, acidose metabólica. Mediante a hipótese, iniciaram tratamento com biotina, também obtendo melhora.

Os achados de eletroencefalograma descritos para as diversas manifestações convulsivas variavam desde traçados normais, lentificações difusas até descargas epileptiformes e surto-supressão (SALBERT et al., 1993a).

O sistema nervoso central (SNC) é comprometido de forma irreversível, na maioria dos casos de deficiência total de biotinidase. Este acometimento preferencial pode encontrar explicação no fato de que o cérebro parece ser inábil em reciclar a biotina endógena, ou seja, existe baixa concentração de biotinidase no cérebro (SUCHY et al., 1985). Há ainda relatos de grande concentração e atividade da enzima piruvato carboxilase (vide fig.2), no cérebro. Isto se deve à taxa de utilização de glicose, que é elevada neste órgão.

Com a falta de ativação da piruvato carboxilase, a metabolização do piruvato se dá no sentido de formação do lactato. Este produto é reconhecidamente neurotóxico, e seu acúmulo acarreta nos sintomas neurológicos encontrados (DIAMANTOPOULOS et al., 1986).

O cerebelo tem taxa de fluxo sanguíneo inferior aos demais órgãos do SNC, permitindo que se acumulem substâncias tóxicas resultantes da desordem metabólica, incluindo o lactato (SUCHY et al., 1985).

Os transtornos metabólicos acima descritos também são responsáveis pelos achados de neuroimagem. A tomografia computadorizada de crânio (TCC) e a ressonância nuclear magnética (RNM) podem ser normais em qualquer fase da evolução da doença, assim como podem exibir sinais de edema cerebral, baixa atenuação da substância branca cortical e proeminência dos sulcos corticais e ventrículos laterais, sugerindo atrofia cortical. O lactato acumulado tanto é responsável pela formação de edema quanto pelo retardo de mielinização. BOUSOUNIS et al. (1993) relataram os achados de atrofia cortical em neuroimagem de pacientes comprovadamente com deficiência de biotinidase, apresentando reversão da atrofia com o tratamento.

Entre os achados de neuroimagem estão calcificações de gânglios basais. A possível explicação para esta susceptibilidade estava no fato de estes núcleos serem metabolicamente ativos (SCHULZ et al., 1988).

Os poucos relatos existentes a respeito de achados neuropatológicos são decorrentes de casos com diagnóstico de deficiência de biotinidase, e que foram a

óbito. Essas crianças que tiveram um curso fatal da doença, exibiam sinais clínicos que levaram a um diagnóstico errôneo de Síndrome de Leigh (encefalopatia necrotizante subaguda). Relata-se a presença de lesões necróticas em hipotálamo, tálamo e hipocampo, também em bulbo e coluna posterior da medula espinhal, simetricamente. Nestas lesões havia microcavitação com áreas de gliose e neovascularização. (HONAVAR et al., 1992) As alterações patológicas também se estendiam ao corpo caloso, fornix, corpos mamilares e substância cinzenta periaquedutal (BAUMGARTNER et al., 1989).

Achados semelhantes são observados na encefalopatia de Wernicke, incluindo o acometimento de estruturas como os corpos mamilares, que são característicos nesta doença (HONAVAR et al., 1992).

À semelhança da Síndrome de Leigh em sua forma infantil, os pacientes apresentavam hipotonia, regressão do DPM, ataxia e atrofia óptica. Com a evolução da doença, distúrbios respiratórios dominaram o quadro, com hiperventilação central, hipoventilação e apnéia. Estes últimos associados ao coma metabólico são responsáveis pelo curso fatal da doença (BAUMGARTNER et al., 1989; HONAVAR et al., 1992; OGIER et al., 1992).

A explicação fisiopatológica para esses fenômenos é o acúmulo de lactato, proveniente da piruvato carboxilase inativa. Esta enzima também está envolvida na fisiopatologia da Síndrome de Leigh e da deficiência de tiamina (encefalopatia de Wernicke) (MITCHELL et al., 1986).

O cerebelo também se mostra acometido pela espongiose na substância branca e núcleos cerebelares (BAUMGARTNER et al., 1989).

Os achados neuropatológicos graves e um curso potencialmente fatal justificam o diagnóstico precoce da doença e explicam as sequelas neurológicas apesar do tratamento, quando instituído tardiamente (HONAVAR et al., 1992).

A evolução letal súbita fica evidente no relato de um caso de BURTON et al. (1987) O paciente apresentou desenvolvimento normal até cinco meses de idade, quando iniciou quadro de epilepsia refratária, atraso do DPM, alopecia e letargia.

Houve piora do nível de consciência até a morte, que ocorreu subitamente. O diagnóstico de deficiência de biotinidase foi feito retrospectivamente pelo estudo da atividade da enzima nos pais e avós, que foi constatado serem heterozigotos para a doença.

Os distúrbios do SNC ainda incluem os sinais oftalmológicos. A neuropatia óptica resultante da desordem metabólica é um achado relativamente comum, 19% dos 78 casos sintomáticos de deficiência total de biotinidase (SALBERT et al., 1993b). Na publicação mencionada citam-se as complicações oftalmológicas mais encontradas nessa doença; as infecções representadas por conjuntivite e ceratoconjuntivite aparecem em 19% dos casos. Outros achados são mencionados em frequência inferior às citadas.

A atrofia óptica, que aparece como um dos sintomas irreversíveis mais comuns na deficiência total de biotinidase, pode se manifestar mais tardiamente, como relataram RAMACKERS et al. (1992/1993). Os autores descreveram um paciente que aos dez anos de idade apresentou amaurose súbita, com outros sintomas neurológicos. Suspeitaram de deficiência de biotinidase por associação ao perfil metabólico característico, que será descrito mais tarde.

A hipoacusia neurosensorial é relatada desde o início das descrições de deficiência total de biotinidase. A etiologia desta surdez foi atribuída por muito tempo, ao acúmulo de biocitina (vide fig.3) que é considerada uma substância neurotóxica (WOLF et al., 1983b). Porém, estudos recentes procuraram explicar esta consequência clínica da doença com modelos experimentais em ratos, e atribuíram ao metabolismo dos lipídeos. Os autores consideraram que alterações no metabolismo dos ácidos graxos, principalmente aqueles com alto índice de “turnover”, tais como os que estão relacionados ao desenvolvimento do SNC, resultam em retardo no processo de mielinização, acometendo estruturas como as vias auditivas no tronco cerebral (RYBAK et al., 1991).

Um dos sintomas cardinais da deficiência de biotinidase são as lesões cutâneas. As alterações clássicas são alopecia e dermatites, tanto atópica quanto

seborreica (WOLF et al., 1994). As lesões distribuem-se preferencialmente em regiões peri-orificiais (LIKURA et al., 1988).

Há relatos também de “rash” eritematoso difuso e descamações superficiais, tipo pele seca (DE PARSCAU et al., 1989).

A constância de achados dermatológicos na deficiência de biotinidase deve alertar os médicos para este diagnóstico, principalmente nos casos de dermatites refratárias aos tratamentos convencionais (MARANDIAN et al., 1987).

A presença de sinais cutâneos pode ser explicada por alterações no metabolismo dos ácidos graxos, embora não esteja totalmente elucidada (MUNNICH et al., 1980; RIUDOR et al., 1989).

Assim como se desconhece a exatidão das anormalidades na pele dos acometidos por essa desordem, também se desconhece a causa da disfunção imunológica neles evidenciada. Esta inumodeficiência é representada pela susceptibilidade a infecções de repetição, conseqüentes a anormalidades na imunidade celular e humoral.

Estudos da imunorregulação de pacientes com deficiência total de biotinidase, demonstraram retardo na resposta a hipersensibilidade cutânea à *Candida* sp e deficiência de IgA, redução no número de linfócitos T e B (WOLF et al., 1994).

Entretanto estudos mais detalhados da função imunológica devem ser realizados em indivíduos com deficiência de biotinidase, para melhor explicar o fenômeno. As alterações na síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (WOLF et al., 1994) e o acúmulo de metabólitos tóxicos seriam fatores explicativos da imunodeficiência adquirida (HURVITZ et al., 1989).

Os distúrbios respiratórios também são descritos na deficiência de biotinidase. O estridor laríngeo foi relatado em dois pacientes (DIONISI-VICI et al., 1988; TOKATLI et al., 1992), que apresentaram laringite aguda. Na evolução, estes apresentaram sintomas neurológicos e alterações metabólicas características, que auxiliaram o diagnóstico da deficiência enzimática. A explicação fisiopatológica para o estridor laríngeo está relacionada com a deficiência da enzima piruvato carboxilase,

que provoca o acúmulo de lactato, capaz de causar toxicidade em estruturas tronco cerebral. Assim, os distúrbios respiratórios relatados têm origem na disfunção do SNC.

As anormalidades bioquímicas encontradas na deficiência de biotinidase são decorrentes da inativação das carboxilases, como já descritas anteriormente. A desordem combinada das quatro carboxilases resulta em acidose metabólica láctica e cetoacidose, também hiperamonemia e hipoglicemia (WOLF et al., 1994).

A acidúria orgânica encontrada freqüentemente na deficiência de holocarboxilase sintetase não é evidenciada em alguns casos de deficiência de biotinidase. Mas, quando presente, mantém o padrão característico de desordem do metabolismo da biotina. Os ácidos orgânicos podem se apresentar de acordo com a carboxilase deficiente, como, por exemplo, a deficiência de propionil-CoA carboxilase proporciona acúmulo de ácido propiônico no sangue e aumento da excreção urinária de  $\beta$ -hidroxipropionato e metilcitrato; já a deficiência de  $\beta$ -metilcrotonil-CoA carboxilase é responsável pela excreção urinária de  $\beta$ -hidroxivalerato,  $\beta$ -metilcrotonato e  $\beta$ -metilcrotonilglicina (GRETER et al., 1985; NYHAN, 1988).

Uma das explicações aceitas para o fato de haver sintomatologia neurológica e cutânea sem evidenciar acidúria orgânica, é o fato de que não há correlação entre a biotina sérica e a tissular, ou seja, pode haver acúmulo de substâncias tóxicas intracelulares na pele e no cérebro, enquanto a atividade das carboxilases está satisfatória em outros órgãos (SWICK et al., 1983).

WOLF et al. (1983a), demonstraram que o defeito enzimático é decorrente da deficiência da atividade da enzima. No entanto, há relato de um caso de deficiência de biotinidase com elevado  $K_m$  para o substrato (RAMACKERS et al., 1992).

Os métodos que identificam os portadores de deficiência de biotinidase são baseados na determinação da atividade da enzima. O fundamento do teste é medir a capacidade de liberação de p-aminobenzoato de um substrato artificial, N-biotinil p-aminobenzoato. O composto liberado sofre reação de diazotação,\* que interage com

---

\* Processo de obtenção de compostos de diazônio a partir de aminas aromáticas.

um derivado naftol, desenvolvendo cor que deve ser interpretada ao final do processo. A interpretação do teste pode ser visual, densidade óptica ou com monitorização fluorimétrica (HAYAKAWA et al., 1986).

A deficiência de biotinidase pode ser dividida de acordo com a atividade da enzima em total e parcial. A deficiência total é definida pela atividade de biotinidase menor ou igual a 10% da atividade normal da enzima. A deficiência parcial é considerada nos casos em que o valor da atividade se situa entre 10 e 30% do valor normal. Estes intervalos são obtidos mediante diluição proporcional de soro ou plasma sabidamente normais (McVOY et al., 1990).

O curso clínico da deficiência parcial ainda não é totalmente conhecido, embora até o momento pesquisas indiquem que a evolução é benigna. Mc VOY et al. (1990) reportaram a experiência de acompanhar dezesseis crianças portadoras de deficiência parcial de biotinidase identificadas por “screening” neonatal. Somente uma das dezesseis crianças apresentou hipotonia e alopecia, que reverteram com o tratamento.

Nesta publicação os autores inferem que as manifestações sintomáticas da doença não dependem somente do grau de deficiência enzimática, mas sim da interação de outros fatores, tais como biotina livre exógena, demanda metabólica da vitamina e “stress” que o paciente sofra (McVOY et al., 1990).

Pode-se evidenciar, ainda, deficiência de biotinidase adquirida em pacientes portadores de doença hepática crônica descompensada, pois a produção da enzima ocorre nesse órgão, como já mencionado anteriormente (NAGAMINE et al., 1993).

O tratamento da deficiência de biotinidase consiste na administração de doses farmacológicas de biotina via oral diariamente. As doses consideradas farmacológicas variam entre 5mg a 20mg por dia. A escolha da dose ideal ocorre de forma empírica (WOLF et al., 1994).

As conseqüências clínicas causadas pela desordem metabólica na deficiência de biotinidase são evitadas e podem ser revertidas pelo tratamento. As lesões cutâneas

e a disfunção imunológica apresentam sinais de melhora em um período de uma a duas semanas (LIKURA et al., 1988; WOLF et al., 1994); a normalização do quadro bioquímico e do estridor laríngeo pode ser evidenciada em horas, a contar com a instituição do tratamento (TOKATLI et al., 1992).

Os sintomas neurológicos não são revertidos totalmente, levando-se em consideração o grau de agressão dos tecidos no período da descompensação metabólica. Entretanto, há melhora clínica nos sintomas, tais como controle das convulsões, retomada das aquisições do DPM; pode ainda ocorrer melhora do tônus muscular e na ataxia de marcha. O controle das crises convulsivas refratárias acontece nos primeiros dias do tratamento, já os outros sintomas demonstram sinais de melhora após período de oito meses (RAMACKERS et al., 1993).

A hipoacusia neurosensorial e a atrofia óptica não são reversíveis com o tratamento, ficando como seqüela da doença que não teve diagnóstico e tratamento precoces (RAMACKERS et al., 1993).

O quadro clínico com que se apresenta a deficiência de biotinidase tem caráter inespecífico, podendo ser confundido com doenças infecciosas (sepsis), cardiorespiratórias e de origem gastrointestinal. A presença de acidose cetolática e hiperamonemia faz suspeitar de erro inato do metabolismo, que se torna mais evidente na consideração diagnóstica quando está presente o padrão característico dos ácido orgânicos (WOLF et al., 1991a).

O tratamento empírico deve ser instituído sempre que houver suspeita clínica, pois a melhora é evidenciada de forma imediata e não compromete o diagnóstico. Sendo assim, o diagnóstico da deficiência de biotinidase deve ser considerado nos casos de epilepsia refratária na infância, disfunção imunológica, anormalidades respiratórias inexplicadas e lesões de pele e/ou alopecia na infância (WOLF et al., 1991a).

A variação e a inespecificidade com que se apresenta a deficiência de biotinidase, assim como a presença de complicações debilitantes que não revertem com o tratamento, fortalecem a idéia do diagnóstico precoce no período neonatal.

### 3.3 "SCREENING" PARA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE

As medidas preventivas de detecção precoce das doenças que causam distúrbios no desenvolvimento, passam a ocupar lugar mais definido a partir da organização dos programas, que avançam dinamicamente visando abranger um número cada vez maior de doenças pesquisadas.

A deficiência de biotinidase, descrita em 1983, preenche os principais critérios para ser incluída nos programas de "screening" neonatal, são eles:

- a) as crianças afetadas não exibem sintomas da doença ao nascimento;
- b) a doença gera sequelas neurológicas graves, e até a morte;
- c) o método de detecção da doença é efetivo e economicamente viável, e
- d) o tratamento é conhecido e acessível, prevenindo todas as manifestações clínicas.

Em 1984, HEARD et al. desenvolveram teste de triagem para deficiência de biotinidase, assim como o teste confirmatório. O teste de triagem consiste na liberação de ácido para-amino benzóico (PABA) pela ação da biotinidase. Este PABA liberado para ser identificado sofre diazotação, portanto se a biotinidase estiver presente e ativa ao final da reação, visualiza-se cor rosa, do contrário não desenvolve cor alguma. Desta forma, afere-se a atividade da biotinidase para o diagnóstico e não a presença de metabólitos acumulados que seria uma medida indireta da deficiência enzimática.

Na fase de implantação do teste, foram verificadas substâncias que poderiam interferir com o resultado, produzindo principalmente o teste falso-negativo. As medicações testadas foram antibióticos e anticonvulsivantes comumente usados. A biotina também é incapaz de falsear o teste. O grupo das sulfonamidas é o único capaz de reagir falseando o teste (HEARD et al., 1984).

A amostra sanguínea necessária para a dosagem é obtida com a punção do calcanhar do recém-nascido, e colhida em papel de filtro. Este procedimento é o mesmo idealizado por GUTHRIE (1992) para dosagem da fenilalanina.

A fim de estabelecer a prevalência da deficiência de biotinidase, WOLF e HEARD em 1984 convocaram doze países a realizarem o teste rotineiramente. Os países e as respectivas prevalências se encontram-se no quadro 1 (WOLF et al., 1990a).

QUADRO 1 - PAÍSES CONVOCADOS A REALIZAR "SCREENING" PARA BIOTINIDASE E RESPECTIVAS PREVALÊNCIAS

PAÍSES	CIDADES, PROVÍNCIAS, REGIÕES, ESTADOS E TERRITÓRIOS	NÚMERO DE RECÉM- NASCIDOS TRIADOS	NÚMERO DE RECÉM-NASCIDOS COM DEFICIÊNCIAS DE BIOTINIDASE	
			TOTAL	Parcial
Austrália	New South Wales <sup>(1)</sup>	178 078	0	0
	Queensland <sup>(2)</sup>	75 000	0	0
Áustria	Todo	215 000	2	3
Canadá	Columbia Britânica	119 390	0	1
	Manitoba	45 175	0	0
	Quebec	193 000	4	10
Itália	Torino	91 000	0	2
	Verona	102 000	2	2
Japão	Cidade de Sapporo	77 066	0	0
	Tóquio	40 000	0	0
México	Cidade do México	3 000	0	0
Nova Zelândia	Todo	166 800	5	0
Escócia	Todo	100 00	0	0
Espanha	Madrid	45 000	0	3
	Murcia	41 367	0	0
	Santiago	27 727	0	0
Suiça	Todo	154 300	1	1
Estados Unidos	Alabama	118 000	0	0
	Illinois	548 500	0	0
	Maryland <sup>(3)</sup>	221 021	2	3
	Massachusetts <sup>(4)</sup>	93 000	3	6
	Michigan	219 059	2	1
	Nebraska	32 000	0	2
	New York	544 739	3	0
	Oregon <sup>(5)</sup>	235 832	1	0
	Pensilvânia <sup>(6)</sup>	26 780	0	1
Alemanha	Hannover	280 000	3	3
	Heidelberg	149 000	0	0
TOTAL		4 396 834	32	40

FONTE: WOLF et al., 1990 a

(1) Incluídos recém-nascidos da capital do território australiano.

(2) Incluídos alguns recém-nascidos do norte do território.

(3) Incluídos recém-nascidos de Maryland e Delaware.

(4) Incluídos recém-nascidos somente de Massachusetts.

(5) Incluídos recém-nascidos de Oregon, Nevada, Idaho, Alaska e Madigan Army Base no Estado de Washington.

(6) Incluídos recém-nascidos somente na área de Pittsburgh.

Como se pode evidenciar, a prevalência da deficiência de biotinidase é estimada em 1 caso para 61.067 nascidos vivos. A deficiência total da enzima acontece na proporção de 1:137.401, e a parcial 1:109.921 nascidos vivos. A real prevalência da deficiência de biotinidase não está definida totalmente, mesmo com todo esforço.

Os casos de deficiência de biotinidase identificados pelos programas de “screening”, não exibiam sintomas quando convocados à primeira consulta (HEARD et al., 1986). Se há por parte do paciente, ou melhor, da família, adesão ao tratamento, o paciente deve permanecer assintomático (LAWLER et al., 1992).

Nas regiões onde o “screening” para deficiência de biotinidase no período neonatal não é realizado rotineiramente, os pacientes são diagnosticados tardiamente com os mais variados graus de incapacidades. SUTHERLAND et al. (1991) desenvolveram uma pesquisa para averiguar a frequência com que a deficiência de biotinidase era responsável pelo quadro de deficiência mental de causa não determinada. Os resultados desta pesquisa não indicam que essa desordem metabólica é mais frequente entre os deficientes mentais que na população geral. Embora os autores atribuam total relevância ao diagnóstico dessa doença, uma vez que essa faz parte das desordens tratáveis

Com relação à interpretação dos testes realizados, os testes suspeitos primeiramente eram repetidos do mesmo cartão e, se a suspeita persistisse, realizava-se a reconvocação de um novo cartão contendo a amostra sanguínea do paciente. Os exames repetidos do segundo cartão com resultados normais foram considerados resultados falso-positivos.

Os valores de resultados falso-positivos e falsos-negativos são fundamentais para o cálculo da sensibilidade e especificidade de um teste, no caso o teste “padrão-ouro” é o semiquantitativo colorimétrico para atividade de biotinidase. A sensibilidade é definida como a proporção de indivíduos com a doença, que tem um teste positivo para a mesma; já a especificidade é a proporção de indivíduos sem a doença, que tem um teste negativo (FLETCHER et al., 1989a). Os estudos populacionais até agora

realizados calculam sensibilidade de 100% e especificidade de 99,24% no primeiro cartão, para o teste que tem a finalidade de triar a doença (HEARD et al., 1986).

WOLF et al. (1986) e HEARD et al. (1986) descrevem suas experiências em um ano e com 18 meses de programa no Estado de Virgínia (EUA) e apontam índice de falso-positivos de 0,09% a 0,12%, respectivamente. Os autores desconhecem casos falso-negativos nestes programas de triagem neonatal, a explicação se dá pelo fato de que drogas do grupo das sulfonamidas, que são apontadas como cromogênicas, não são aplicadas aos recém-nascidos. Esses valores são aceitáveis para os testes de rotina.

SUORMALA et al. (1988) resolveram estudar mais cuidadosamente a atividade da biotinidase nos prematuros, na tentativa de estabelecer correlação entre idade gestacional e atividade da biotinidase. A idealização do trabalho surgiu após a verificação de que nesta faixa etária havia índices elevados de resultados falso-positivos, nos “screening” populacionais. Os autores selecionaram 64 prematuros e concluíram que havia uma relação positiva entre idade gestacional e atividade da biotinidase, confirmando os achados de HEARD et al. (1986). O comportamento da atividade da enzima nos primeiros dias de vida nos prematuros permanece como alvo para futuras investigações.

Além de apresentar níveis aceitáveis de resultados falso-negativos e de falso-positivos, mostrando efetividade, o teste semiquantitativo colorimétrico pode ser facilmente incorporado aos testes já realizados, de caráter rotineiro como para fenilcetonúria e para o hipotireoidismo congênito. O material a ser processado é o mesmo, não exigindo procedimentos especiais.

Entre as vantagens descritas para o uso do teste, está a estimativa dos custos para realização deste programa, que é considerado economicamente viável.

Os laboratórios especializados em “screening” neonatal calculam em média US\$ 0,24 por teste realizado (HEARD et al., 1986), situam o custo por teste entre US\$ 0,15 a US\$ 0,40 nos diferentes países (WOLF et al., 1990a). Considera-se o teste como um dos menos dispendiosos, principalmente se comparado com o teste para fenilcetonúria (US\$ 1,50). Isso sem levar em consideração que é incontestável o benefício de evitar que uma criança venha desenvolver retardo mental (TIWARY, 1987).

Devido à relação custo/benefício do programa, dos 29 projetos piloto listado no quadro 1, oito descontinuaram o programa. O principal motivo apontado, por exemplo, na província de Quebec (INTERNATIONAL SCREENING... 1988) e na Escócia (KENNEDY et al., 1989) foi a frequência considerada proporcionalmente baixa, 1:64.400 e a 0:102.393 respectivamente. Entretanto, países como a Itália (1:75.000), Alemanha (1:80.000), Áustria (1:26.836); cidades como Nova York (1:141.000) e mais de cinco Estados americanos (1:60.000) entre outros, consideraram a relação custo/benefício satisfatória e introduziram o teste em seus programas. (WOLF et al., 1990a) Recentemente têm-se notícias que 15 Estados americanos realizam rotineiramente o teste para a atividade de biotinidase (THERRELL, 1993).

Durante as investigações populacionais foram realizadas dosagens de população normal, pelo teste quantitativo, ficando estabelecido o padrão de normalidade. Os valores encontrados se situavam na faixa de 4,9 a 8,8 nmols de PABA liberados/min, o valor de atividade mais alto encontrado foi de 13,11. (WOLF et al., 1990) Ficaram também estabelecidos os valores da deficiência parcial de biotinidase: 1,5 a 3,3 nmols de PABA liberados/min/ml, que corresponde ao intervalo de 10-30% do valor normal, e valores inferiores a 1,5 nmols PABA liberados/min/ml foram encontrados nos casos de deficiência total da enzima. Estes valores correspondem a menos de 10% do valor normal (DUNKEL et al., 1989).

Analisando-se as vantagens apresentadas pelo “screening” para deficiência de biotinidase no período neonatal, os autores responsáveis pelas principais publicações no assunto sugerem que cada Estado, região e nação estude a possibilidade de implantar o programa de detecção precoce desta doença, considerando a relação custo/benefício e prioridades para cada um deles (WOLF et al., 1990a).

## 4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

Realizou-se um trabalho prospectivo na população de 125.000 recém-nascidos no Estado do Paraná, como recomenda a literatura (WOLF et al., 1990a). Os recém-nascidos referenciados perfazem um total de 90% dos recém-nascidos do Paraná - que são registrados na Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE) - como mostra o mapa em anexo (anexo 1). O período de análise compreendeu março a novembro de 1994.

### 4.2 MATERIAL E MÉTODO

#### 4.2.1 Colheita do Material

A amostra sanguínea foi obtida por punção do calcanhar e colhida em papel de filtro Schleicher & Shuell nº 2992, procedimento de rotina nos testes já oficializados (Lei Estadual nº 8627), quais sejam para Fenilcetonúria (PKU) e Hipotireoidismo Congênito (HTC). Estas amostras percorreram um caminho segundo o fluxograma em anexo (anexo 2).

Entre as recomendações para melhor coleta do material, está a absorção da gota de sangue da punção em ambas as faces do papel. Por se tratar de método de detecção enzimática, deve-se deixar secar longe do calor do sol, e até o momento do envio, deve permanecer em refrigerador. Um exemplo do cartão encontra-se em anexo (anexo 3).

#### 4.2.2 Teste Semiquantitativo Colorimétrico para Atividade de Biotinidase

O teste descrito a seguir foi desenvolvido por HEARD et al. (1984).

A atividade de biotinidase foi determinada colorimetricamente, medindo-se a liberação  $\rho$ -aminobenzoato da N-biotinil- $\rho$ -aminobenzoato. E pode ser evidenciada em plasma ou em sangue total colhidos em papel de filtro.

##### **Equipamentos usados:**

- furador de papel 3mm de diâmetro;
- pipetas com capacidade de 30 microlitros;
- incubadora - tipo banho-maria a 37°C
- balanças com escala em microgramas;
- geladeira;
- placa de cultura de células com fundo reto e tampa com diâmetro de 6,4 mm tipo "corning cell wells" 25860;
- luvas;
- filmes de plástico;
- cronômetro;
- recipientes plásticos para os reagentes.

##### **Substâncias químicas:**

- Ácido  $\rho$ -aminobenzóico sal potássico (PABA) ( $C_7H_6NO_2K$ ) PM (Peso Molecular) 175,2 Sigma
- Sulfamato de amônio ( $NH_4OSO_2NH_2$ ) PM 114,1 Sigma
- N-Biotinil  $\rho$ -aminobenzoato sal sódico (B-PABA) ( $C_{17}H_{20}N_3O_4SNa$ ) Sigma
- Albumina sérica bovina fração V (BSA) Sigma lote 41F-0060/A-2153
- N-1-Naftiletilenodiamino diidroclorídrico ( $C_{13}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$ ) PM 259,2 Sigma

- Fosfato de Potássio Dibásico ( $K_2HPO_4$ ) PM 174,18 Reagen PA (Pró-Análise)
- Fosfato de Potássio Monobásico ( $KH_2PO_4$ ) PM 136,09 Reagen PA
- Bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ) PM 84,01 Merck PA
- Nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ) PM 69,0 Sigma
- Ácido tricloroacético (TCA) ( $C_2HCl_3O_2$ ) PM 163,39 Reagen PA
- Ácido etilenodiaminotetraacético dissódico (EDTA) PM 372,24 Vetec P.A. ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ )

**Reagentes:**

- Tampão fosfato de potássio, 0,05 M, pH=6.0:
  - Fosfato de potássio monobásico, 6,80g/1000ml água deionizada (AD)
  - Fosfato de potássio dibásico, 8,71g/1000ml AD

Foram adicionadas partes de A e B até pH final igual a 6,0, ajustou-se o pH usando-se A para aumentá-lo e B para diminuí-lo. Esta solução foi usada como solvente para o tampão substrato (B-PABA).

- Ácido  $p$ -aminobenzóico (0,2M); foram diluídos 3,5mg de PABA em 100ml de tampão fosfato (pH=6,0). Esta solução deve ser guardada a 4°C e tem a função de testar os reagentes 1, 2, 3 e 4, que serão descritos adiante.
- Bicarbonato de sódio, 1M; foram diluídos 8,4g em 100ml AD. Usou-se no preparo do tampão substrato (B-PABA).
- Tampão substrato para biotimidase (B-PABA); foram dissolvidos 5,4mg de B-PABA em 20ml de tampão fosfato e adicionados 100 microlitros de bicarbonato de sódio (1M); o B-PABA estava dissolvido em 1 hora. Foram dissolvidos 25mg de BSA e 185mg de EDTA dissódico, ambos em tampão fosfato. A esta solução adicionou-se solução de B-PABA até um volume aproximado de 80ml. Checou-se o pH desta solução e,

quando necessário, ajustou-se o pH para 6,0, adicionando 0,5M de Hidróxido de potássio (KOH). O volume final foi igual a 100ml, completado com tampão fosfato. Estocou-se em vidro escuro a 4°C. Este substrato permanece estável por pelo menos 8 meses.

- REAGENTE 1 : Ácido tricloroacético (TCA); foram dissolvidos 30g de TCA em 100ml de AD. Esta solução tem o objetivo de parar a reação química; deve ser estocada a 4 C.
- REAGENTE 2 : Nitrito de Sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), foram diluídos 100mg de  $\text{NaNO}_2$  para 100ml de AD. A solução foi preparada diariamente, ou seja, não foi estocada por mais de 24 horas.
- REAGENTE 3 : Sulfamato de amônio ( $\text{NH}_4\text{OSO}_2\text{NH}_2$ ); foram diluídos 500mg de  $\text{NH}_4\text{OSONH}_2$  para 100ml de AD. Esta solução deve ser estocada a 4°C., em vidro escuro.
- REAGENTE 4 : N-1-naftiletilenediamino diidrocloreto, diluiu-se este soluto na proporção de 100mg para 100ml de AD; a solução foi estocada em vidro escuro.

Os reagentes 2, 3 e 4 fazem parte do processo de diazotação.

### **Procedimentos**

- As amostras testadas foram dispostas em disco de 3mm, e no interior de cada orifício da placa.
- Retirou-se o volume suficiente do tampão substrato do refrigerador, para a incubação das amostras disponíveis. Deixou-se equilibrar com a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Foram colocados 30 microlitros do tampão substrato para cada disco de amostra a ser testada.
- A placa foi coberta com papel de filtro, saturado com AD. Garantiu-se que toda placa estivesse coberta. Guardou-se em envoltório plástico.

- Procedeu-se à incubação em banho-maria a 37°C, por um período tal como a rotina indica, de 12 horas a 18 horas. Considerou-se a pernoite.
- Após o período de incubação, procedeu-se à adição dos reagentes. Estes também necessitaram equilíbrio com a temperatura ambiente.
- Foram colocados 30 microlitros do reagente 1, em cada amostra pocinhense.
- Em seguida e da mesma forma, foram colocados 30 microlitros de reagente 2. Usou-se o tempo de 3 minutos da adição do reagente 2 ao 1, para proceder ao passo seguinte.
- Foram adicionados, então, 30 microlitros do reagente 3. Aguardou-se o tempo de 3 minutos antes de executar a última mistura.
- Por fim, foram adicionados 30 microlitros de reagente 4 e procedeu-se à leitura, que não deve exceder o tempo de 20 minutos.

#### **Montagem do controle de qualidade**

- Para cada teste a ser realizado, elaborou-se um placa ainda não usada. Nela foram colocadas as amostras-controle sem atividade e atividade normal (100%). Ainda nesta placa “confete” do papel de filtro cortado ao meio, correspondendo a 50% do valor normal e cortado em cruz, colocou-se um quarto do papel picotado, que equivalia a 25% do valor normal. Os resultados eram comparados com esses padrões, repetiam-se os exames daqueles que a cor final estivesse igual ou mais pálida que o padrão correspondente a 25% do normal.
- Depositou-se PABA (30 microlitros) no local do placa, sem amostra sangüínea ou tampão substrato, com a finalidade de checar os reagentes 1,2,3 e 4.
- Removeram-se todos os reagentes do refrigerador, exceto o 1 e 2 (este último preparado diariamente), para permitir o equilíbrio com temperatura ambiente antes de serem usados.

- Procedeu-se à adição dos reagentes, conforme orientação, primeiramente com os discos controle. Quando a reação era satisfatória, prosseguia-se com as amostras.
- No caso da cor estar ausente no disco controle normal, assim como no PABA, inferiu-se que o problema estaria nos reagentes (provavelmente no reagente 2). Quando ausente no disco normal, mas presente no PABA, suspeitava-se do tampão substrato ou do TCA.

#### **Leitura e interpretação**

- As amostras normais apresentaram cor rosa, correspondendo à atividade de biotinidase normal (anexo 4).
- As amostras que não desenvolveram cor foram consideradas suspeitas para deficiência de biotinidase.
- As amostras que exibissem cor rosa em tom intenso (superior ao tom do PABA) sugeririam presença de substâncias cromogênicas, tais como sulfonamidas no sangue. Este fato não ocorreu com o trabalho realizado.

#### **Amostras suspeitas**

- Repetiu-se em duplicata do mesmo cartão.
- Quando persistiram exibindo coloração inferior a 25% da atividade normal, procedeu-se à reconvocação para coleta de nova amostra, também em papel filtro, ou seja, um novo cartão.
- Este novo cartão foi submetido, em duplicata, ao teste semiquantitativo.
- Procedeu-se ao teste quantitativo confirmatório para deficiência de biotinidase, somente quando o segundo cartão permaneceu suspeito. Fez-se, portanto, nova reconvocação, nesta situação.
- Nas amostras com suspeita de presença de substâncias cromogênicas, seria procedida à reconvocação para um novo cartão. Repetir-se-ia o teste semiquantitativo em duplicata, sendo que em uma delas não se

colocaria o tampão substrato. A reação final não deveria desenvolver cor nesta amostra; se assim o fizesse, indicaria presença de substância cromogênica.

#### 4.2.3 Reconvocação

A reconvocação para coleta da amostra num segundo cartão foi executada por meio de contato telefônico e cartas. Os telefonemas foram dirigidos aos hospitais onde os crianças haviam nascido, ou, em algumas localidades, às Secretarias de Saúde Municipal ou Posto de Saúde.

As pessoas contatadas recebiam explicação do trabalho realizado.

#### 4.2.4 Teste Quantitativo para Deficiência de Biotinidase

Consiste em um teste de leitura colorimétrica, medindo-se desta forma a liberação de p-aminobenzoato de N-biotinil-p-aminobenzoato (Wolf et al., 1990b).

Utilizou-se plasma ou soro. As amostras foram colhidas e transportadas em gelo, até que fossem centrifugadas e separadas em alíquotas, para serem congeladas (a -70°C).

#### Reagentes usados

- Tampão fosfato de potássio, 0.2M. Esta solução foi preparada com fosfato de potássio dibásico ( $K_2PO_4$ ), a 0.2M (17.4g em 500ml de AD); e fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) a 0.2M (13.6g em 500ml). Foram misturadas na proporção de 1:9, e ajustado o pH em 6,0. Quando necessário, foi usado o dibásico para aumentar o pH, e o monobásico para diminuir o pH. Esta solução foi estocada a 4°C e é estável por pelo menos um ano.
- Ácido p-amino benzóico (PABA) 0.5nM. Foram diluídos 8.76 mg em 100ml, e guardou-se em refrigerador a 4°C.

- Ácido etilenediaminotetraacético dissódico (EDTA), 100nM. Foram diluídos 3.72g de EDTA em 100ml de AD. Guardou-se em temperatura ambiente.
- Albumina sérica bovina (BSA). Dilui-se na proporção de 0.5mg de BSA para 0.5ml de AD. Foram preparadas 50ml desta solução e estocou-se em alíquotas a -20°C.
- N-biotinil-p-aminobenzoato (N-B-PABA), 1,5nM. Foram diluídos 11.56mg de N-B-PABA em 20ml de AD. Estocou-se a solução a -20°C em alíquotas. Não devem ser recongeladas.
- Ácido tricloroacético (TCA), a 30%. Foram adicionados 30ml de TCA a 100% (com muita cautela) a AD até volume final de 100ml. Transferiu-se a solução para um frasco escuro, para ser estocada a 4°C.
- Nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>), a 0.1%. Foi preparado diariamente na proporção de 1mg/1ml de AD, o volume a ser utilizado.
- Sulfamato de amônio (NH<sub>4</sub>OSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). Foram diluídos 500mg do soluto em 100ml de AD. A solução foi estocada em frasco escuro a 4°C.
- N-1-naftiletilenediamino diidrocloreto, foram diluídos 100mg deste composto em 100ml de AD. Guardou-se em vidro escuro a 4°C.

#### **Aparelhos utilizados:**

- Espectrofotômetro (Coleman juniorII modelo 6/20)
- Centrífuga (PARSEC modelo B-8)

#### **Controle de qualidade**

- Preparou-se um tubo branco (AD ao invés de soro), para cada grupo de teste realizado.
- Incluiu-se um controle com soro de atividade de biotinidase normal, já conhecido.

- Descongelaram-se as amostras a serem testadas, imediatamente antes do início do teste.
- **Todas** as amostras, padrão ou não, foram testadas em duplicata.
- Para todos os grupos de teste, preparou-se a curva padrão de PABA, que será descrito adiante.

#### Execução do processo

- Em **todos** os tubos foram depositados os seguintes reagentes: tampão fosfato 1ml; EDTA 0,2ml e BSA 0,5ml.
- Para os tubos que continham soro e o branco, adicionou-se o substrato N-B-PABA 0,2ml
- Diluiu-se PABA em AD como orienta a rotina :

concentração (nmols)	PABA (microlitros)	AD (microlitros)
0	0	300
12,5	25	275
25	50	250
50	100	200

- Todos os tubos foram deixados em pré-incubação por 15 minutos, a 37°C.
- Adicionou-se 0,1ml de AD ao tubo branco. E iniciou-se a reação nos demais tubos, adicionando-se 0,1ml de soro. Sempre homogeneizando-se.
- **TODOS** os tubos (inclusive a curva padrão do PABA) permaneceram em incubação por 30 minutos, em banho-maria a 37°C.
- Usou-se 0,2ml de TCA, com a finalidade de parar a reação em todos os tubos.
- Centrifugaram-se os tubos por 10 minutos, em temperatura ambiente.
- Removeu-se 1,5ml do sobrenadante, colocando em outro tubo limpo.

- Adicionou-se 0,5ml de AD em todos os tubos.
- Colocou-se 0,2ml de NaNO<sub>2</sub>, homogeneizando. Para proceder ao passo seguinte aguardou-se o tempo de 3 minutos.
- Adicionou-se,então, 0,2ml de Sulfamato de Amônio a 0,5%. Foram esperados 3 minutos para a adição do último reagente.
- Colocou-se 0,2ml de N-1-naftiletilenediamino diidrocloreto. Procedeu-se à incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, fazendo-se a leitura em seguida.
- Após calibragem adequada do espectrofotômetro, foi feita leitura óptica, com absorbância de 546nm.
- Em seguida construiu-se um gráfico, anexo 5. O resultado é fornecido na unidade de nmols PABA liberado/minuto/ml, segundo a fórmula que se segue:

$$\frac{nmol}{30min} \times \frac{1}{0,1ml(amostra)}$$

- O gráfico exposto no anexo 5 foi escolhido para representar os diversos gráficos realizados a cada montagem do teste quantitativo.

#### 4.3 REFERENCIAL DOS VALORES NORMAIS NOS ADULTOS

Com a finalidade de comparar com os valores de normalidade indicados na literatura, analisaram-se 20 amostras de doadores normais pelo teste quantitativo colorimétrico. (DUNKEL et al., 1989)

## 4.4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA

### 4.4.1 Aspectos Técnicos

As dificuldades caracterizadas como técnicas podem ser relacionadas com o processo da coleta e/ou estoque inadequados da amostra sanguínea que foram problemas que antecederam a chegada do material no laboratório. Durante as etapas cumpridas no laboratório, a energia elétrica interrompida e a temperatura do banho-maria abaixo de 37°C contribuíram para alteração na leitura final, aumentando o número de repetições dos testes.

### 4.4.2 Aspecto Social

A reconvocação acarretou limitação de caráter social ao trabalho. Entre esses podem ser listados :

- a rotatividade dos profissionais envolvidos no programa nos diversos estabelecimentos conveniados;
- a falta de empenho destes em localizar os recém-nascidos suspeitos;
- o preenchimento inadequado do cartão de exame, em relação ao endereço, nome ou mesmo peso, dificultou o acesso aos pacientes e a análise dos casos suspeitos;
- a mudança de endereço das famílias suspeitas, fazendo-as incomunicáveis;
- a recusa dos próprios pais em responder à solicitação de um novo exame, e
- a dificuldade de acesso às famílias quando estas residiam em zona rural.

## 4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O número de casos obtidos foi analisado por meio de cálculos de prevalência (FLETCHER et al., 1989a). Foram usados, também, cálculos de sensibilidade e especificidade para analisar o teste semiquantitativo (FLETCHER et al., 1989b). O

teste semiquantitativo foi considerado "padrão ouro", pois a literatura definiu o teste falso-positivo como sendo todo indivíduo que necessitou o segundo cartão (WOLF et al., 1990a).

Os valores de normalidade encontrados no grupo de referencial de normalidade nos adultos, que foram avaliados pelo teste quantitativo, submeteram-se à estatística descritiva, com cálculo do valor médio e desvio padrão (HOEL, 1981).

## 5 RESULTADOS

As amostras foram testadas primeiramente em unidades, os casos suspeitos foram repetidos em duplicata. A taxa de repetições em duplicata variou de 0,9% a 0.5%, do total de exames realizados por mês.

Quando as amostras persistiam exibindo coloração em níveis inferiores a 30% da atividade normal, prosseguiu-se à reconvocação de uma nova amostra sanguínea (positivo). A taxa de reconvocação foi de 0,17%. Dos 212 casos de reconvocação, 70% (n=149) enviaram novo cartão com material e 30% (n=63) não repetiram o exame.

Os 63 casos que não tiveram novo exame realizado apresentaram como causa:

- a) mudança de endereço confirmada (n=6);
- b) recusa da nova coleta (n=5);
- c) óbito antes do segundo exame (n=2);
- d) habitação em zona rural (n=20), dificultando o acesso às famílias;
- e) sem causa estabelecida (n=30).

Do total de repetições, 147 tiveram o segundo exame normal. Por definição, são os casos falso-positivos.

### 5.1 PREVALÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE

No período de estudo foram identificados 2 casos de deficiência de biotinidase, sendo 1 de deficiência parcial e o outro de deficiência total.

A prevalência da doença na população de estudo é de 1:125.000 para deficiência parcial, 1:125.000 para deficiência total e 2:125.000 para deficiência combinada.

## 5.2 DESCRIÇÃO DOS CASOS ENCONTRADOS

A criança portadora de deficiência parcial de biotinidase (caso 1) é do sexo feminino, branca, filha única de casal não consanguíneo. A gestação evoluiu sem intercorrências, nasceu de parto cesareana com peso de 3210g. Segundo a mãe, esta criança nasceu cianótica e demorou para chorar, porém apresentava boa sucção e não necessitou de maiores cuidados. A paciente foi avaliada com 60 dias de vida, apresentou exame físico e DPM normais. A partir do diagnóstico de deficiência parcial, iniciou-se o tratamento com biotina 5 mg por dia.

O valor da atividade de biotinidase por meio de teste quantitativo colorimétrico é demonstrado na tabela 1. Os pais também foram submetidos ao teste quantitativo, podendo-se evidenciar os resultados na mesma tabela.

A criança portadora de deficiência total (caso2) é do sexo feminino, segunda filha, branca, de pais não consanguíneos. Pré-natal e parto sem intercorrências, peso ao nascimento de 2700g. A primeira consulta foi com 41 dias, não havia qualquer sintoma e o DPM estava adequado à idade. Em consulta com 4 meses de idade, apresentava varicela e conjuntivite, estava em uso de biotina 5mg por dia. Aumentou-se a dose de biotina para 10mg por dia. Atualmente a criança encontra-se assintomática, mantendo DPM normal.

O valor da atividade da biotinidase da menor e de seus pais encontra-se exposto na tabela 1.

TABELA 1 - VALORES DA ATIVIDADE DE BIOTINIDASE NOS CASOS IDENTIFICADOS

	VALOR DA ATIVIDADE DA BIOTINIDASE <sup>(1)</sup>				
	Criança	Mãe	Pai	Valor Normal <sup>(2)</sup>	
				Média	Limites
Caso 1	<sup>(3)</sup> 3,3	5,0	4,9	7,31	5,0 a 11,3
Caso 2	0,9	4,1	4,5		

FONTE: Dados pesquisados

(1) nmol de PABA liberado/min./ml.

(2) O padrão de normalidade nas 20 amostras. Com média de 7,31 ± 2,35dp.

(3) Exames confirmados por Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.

### 5.3 CÁLCULO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE PARA O TESTE SEMIQUANTITATIVO COLORIMÉTRICO

Para o cálculo da sensibilidade e especificidade são necessários números de falso-positivos e falso-negativos. A sensibilidade de um teste é definida como a proporção de indivíduos com teste positivo que realmente apresentam a doença; a especificidade é a proporção de indivíduos sem a doença que apresentam teste negativo. A tabela 2 exibe os valores necessários aos cálculos, que são demonstrados na seqüência.

A sensibilidade do teste semiquantitativo colorimétrico é de 100% e a especificidade é de 99,88%.

TABELA 2 - NÚMEROS DE FALSO-POSITIVOS, FALSO-NEGATIVOS E CASOS IDENTIFICADOS

		DEFICIÊNCIA BIOTINIDASE	
		Presente	Ausente
Teste Semiquantitativo Colorimétrico	Positivo	02	147
	Negativo	0	124 788

FONTE: Dados pesquisados

$$Sensibilidade = \frac{2}{2+0} = 1 (100\%)$$

$$Especificidade = \frac{124\,788}{147 + 124\,788} = 0,9988 (99,88\%)$$

## 5.4 CUSTO DO PROGRAMA

Os itens relevantes e específicos ao custo da implantação do programa e seus valores totais estão listados na tabela 3.

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS CUSTOS DO PROGRAMA

INFRA-ESTRUTURA NECESSÁRIA	CUSTOS (em US\$) <sup>(1)</sup>
Equipamento	7 079,00
Reagentes	351,50
Serviço Telefônico e Correio	1 000,00
<b>TOTAL<sup>(2)</sup></b>	<b>8 430,50</b>

FONTE: Dados pesquisados

(1) Os custos do programa estão expressos em dólar, pela estabilidade que apresenta esta moeda.

(2) O cálculo de custo por exame foi de US\$ 0,07 aproximadamente.

## 5.5 CUSTO DO TRATAMENTO

Por meio de comunicação pessoal dos pais que fizeram a compra da medicação, a informação é de que o custo mensal foi de aproximadamente US\$ 12,00.

## 6 DISCUSSÃO

A prática de programas de "screening" neonatal não tem somente beneficiado pacientes e suas famílias, mas também tem permitido maiores informações sobre epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento das doenças.

Para o estudo da deficiência de biotinidase recomenda-se no mínimo uma população de 100.000 recém-nascidos, para obtenção de resultados mais fidedignos, pois pela experiência mundial, a doença pode acontecer na proporção de 1:49.000 até 1:137.000 (WOLF et al., 1990a).

KENNEDY et al.(1989) publicaram seus resultados em 18 meses de experiência com "screening" para deficiência de biotinidase. Triaram 102.393 recém-nascidos, com índice de reconvocação de uma nova amostra sanguínea de 0,02% e não encontraram casos da doença. Consideraram uma prevalência muito baixa, e não sugeriram a inclusão deste teste no programa de rotina.

SCHWEITZER (1994) em estudo colaborativo de nove anos (1985-1993), após triarem 795.000 recém-nascidos, detectaram 10 crianças portadoras de deficiência total da enzima e 23 com deficiência parcial. Consideraram a frequência satisfatória e recomendam o "screening" neonatal em massa.

Na Hungria, HAVASS (1991) descreve sua experiência com 43.493 recém-nascidos, que apresentaram 0,14% do total em reconvocação e detectaram dois casos com atividade residual de biotinidase.

BURLINA et al. (1988) em estudo prospectivo de 6 meses na Itália, identificaram um caso de deficiência de biotinidase, entre 24.300 recém-nascidos. Consideraram a desordem metabólica para inclusão das doenças a serem pesquisadas no período neonatal.

Neste estudo seguiu-se a recomendação de uma população mínima de 100.000, e a prevalência encontrada foi de 1:125.000, que se situa no intervalo de

confiança de proporções da literatura (WOLF et al., 1990a). Levando-se ainda em consideração que 30% dos casos suspeitos não tiveram repetição do novo teste, pode-se supor que mais casos de deficiência da enzima eventualmente não foram detectados. Embora os dados sobre a prevalência da deficiência de biotinidase exijam mais estudos para ser estabelecida, estes dados preliminares sugerem que esta deficiência é mais freqüente que a galactosemia, doença do xarope do bordo e homocistinúria (LEVY, 1993).

A deficiência parcial de biotinidase pode ainda ser subestimada, pois muitos programas de “screening” neonatal solicitam o segundo cartão somente quando há suspeita de deficiência total da enzima, ou melhor, níveis de coloração igual ou menor que 10% da atividade normal (DUNKEL et al., 1989). Isto se deve ao fato de que a deficiência parcial tem um curso benigno, e na maioria das vezes somente o acompanhamento clínico basta. Mas na verdade não se sabe ao certo em que momento do desenvolvimento essas crianças podem se tornar sintomáticas, e também porque é a única forma de se tentar identificar os heterozigotos para a doença, uma vez que isto só seria possível se o teste de triagem fosse quantitativo colorimétrico ou fluorimétrico. Na pesquisa em questão, optou-se por reconvocar os exames que exibissem coloração compatível com níveis iguais ou menores que 25% do valor normal (McVOY et al. 1990).

Quanto às particularidades dos casos encontrados nesta pesquisa, o fato de ambos serem do sexo feminino, não é significativo, uma vez que esta desordem metabólica não tem predomínio entre os sexos. A grande maioria dos casos encontrados na literatura é da raça branca, embora tenham sido descritos casos em que os pacientes são da raça negra. A não referência a um maior número de casos na raça negra pode estar vinculada ao fato de não existirem trabalhos populacionais em que esses indivíduos tenham uma representação mais significativa. No estudo de prevalência no Japão não se detectou casos em 100.000 recém-nascidos, fazendo-se a inferência que a deficiência de biotinidase seja ainda mais rara entre os asiáticos (DUNKEL et al., 1989).

O único paciente portador de deficiência parcial apresentou-se assintomático desde a primeira consulta, permanecendo deste modo até hoje. A literatura recomenda manter sem a biotina via oral e com acompanhamento clínico periódico. Neste caso optou-se pelo tratamento com doses terapêuticas baixas de biotina (5 mg/dia). As razões para isto são duas: primeiro, não se sabe com exatidão o curso clínico e em que momento podem sobrevir os sintomas; segundo, porque muitas vezes o acesso a serviços hospitalares e profissionais informados torna-se complicado em nosso meio (WOLF, 1991a).

No trabalho realizado o caso detectado de deficiência total de biotinidase foi confirmado mais precocemente que alguns programas descritos, 41 dias de vida para 60 dias na Itália. A descrição que os autores do “screening” neonatal italiano fazem dessa criança, inclui aparecimento de dermatite e convulsão aos 2 meses de idade, sendo tratada com biotina 10 mg/dia com recuperação completa destes sinais. Ao primeiro exame, a criança do programa paranaense apresentava-se assintomática, porém com 4 meses apresentou conjuntivite, e por isto optou-se pelo aumento na dose de biotina diária, de 5 mg/dia para 10 mg/dia. Até a idade de 6 meses evoluiu com DPM adequado para idade (BURLINA et al., 1988).

LAWLER et al. (1992) publicaram o seguimento dos recém-nascidos com deficiência de biotinidase detectados pelo programa de “screening” neonatal conduzido por um ano em Massachusetts. Entre 99.398 recém-nascidos, três apresentavam deficiência total de biotinidase. No acompanhamento destes casos, todos permanecem assintomáticos, com idade aproximada de 4 anos, e em uso de biotina 10 mg/dia.

Os pais das crianças detectadas pelo programa realizado neste Estado também se submeteram ao teste quantitativo para a atividade de biotinidase. Os valores encontrados neste trabalho, demonstrados na tabela 1, caracterizam a situação de heterozigotos dos pais das crianças afetadas. WOLF et al. (1990a) situam esses valores entre normais e valores para deficiência como sendo valores intermediários.

As dificuldades listadas no capítulo anterior afetaram exclusivamente o procedimento técnico. Por exemplo, a má coleta das amostras sanguíneas, assim como

o estoque inadequado destas, fazendo com que estas ressecassem, foram os responsáveis pelo número de resultados falso-positivos. Este fato ficou evidente após campanha interna do laboratório, que visou orientar a coleta e envio adequados dos cartões, por parte das instituições conveniadas, melhorando o número de reconvocação, que chegou a índices de 0,09% nos últimos meses. Problemas como falha na energia elétrica, fazendo com que o banho-maria não sustentasse a temperatura de 37 C, comprometeram a leitura do resultado, porém aumentando o número de repetições do mesmo cartão. Estes tipos de acontecimentos, porém, não comprometeram os resultados finais.

Já o aspecto social afetou sobremaneira as reconvocações e em consequência o resultado final. As causas identificadas de não obtenção do segundo cartão referem-se a problemas na instituição onde o exame foi colhido, com os familiares e aspectos regionais. Nas instituições conveniadas foi percebida grande rotatividade dos profissionais responsáveis pela coleta do exame, falta de empenho destes em localizar as famílias e preenchimento inadequado dos cartões de exame dificultando o acesso aos casos suspeitos, incluindo sua análise. Os familiares que se recusaram a submeter seus filhos a uma segunda coleta do exame, alegaram ter o “teste do pezinho” normal (no caso, normal para os outros testes investigados), ou que as crianças estavam muito bem, devendo se tratar de um engano. As alegações persistiram mesmo com a explicação da natureza do trabalho realizado. As questões peculiares ao Estado do Paraná dizem respeito ao fato de que um número considerável da população reside em zona rural, o que dificulta a comunicação com as famílias requisitadas.

A baixa adesão à reconvocação desta pesquisa constituiu, assim, o principal obstáculo. WOLF et al. (1990a) revelaram 93,3% de retorno à reconvocação de um segundo cartão do paciente, enquanto esta pesquisa contou com 70%. O número de reconvocações do segundo cartão no estudo de WOLF et al.(1990a) no período de um ano foi de 0,09% (HEARD et al.,1986), em publicações posteriores estes mesmos autores relatam índices de resultados falso-positivos de 0,12%, já com uma experiência de dezoito meses.

Os índices citados têm correspondência imediata com os testes falso-positivos para o teste semiquantitativo colorimétrico, definidos como os indivíduos que necessitaram um segundo cartão contendo a amostra a ser testada e que o segundo exame foi normal. Nesta pesquisa os resultados falso-positivos foram de 212, 0,17% do total de exames realizados. Aproxima-se daquele encontrado por WOLF et al. (1990a).

Na idealização do teste semiquantitativo colorimétrico para deficiência de biotinidase, HEARD et al. testaram concomitantemente a interferência com os mais diversos medicamentos que poderiam gerar falsos-negativos. Os medicamentos abrangiam antibióticos e anticonvulsivantes, e a única droga descrita capaz de modificar-se com o reagente 4\* do processo de diazotação é o grupo das sulfonamidas. Como estes compostos não são comumente usados no período neonatal, não se conhecem casos de falso-negativos neste teste de triagem. Tanto na literatura como no trabalho realizado, não se encontrou reação colorimétrica compatível com a presença dessas substâncias cromogênicas (HEARD et al., 1986).

Com o conhecimento dos falso-negativos e falso-positivos do estudo, faz-se o cálculo da sensibilidade e especificidade do teste considerado "padrão ouro", no caso o teste semiquantitativo colorimétrico para atividade de biotinidase. Os valores calculados para sensibilidade (100%) e para especificidade (99,88%) concordam com valores encontrados na literatura (WOLF et al., 1990a).

A sensibilidade de um teste é a capacidade que este tem de ser positivo, quando a doença está presente, sendo assim com uma sensibilidade de 100% para o teste semiquantitativo colorimétrico raramente se deixará de encontrar uma criança portadora de deficiência de biotinidase. A especificidade é a proporção de indivíduos sem a doença e com teste negativo para a mesma. A especificidade de 99,88% para o teste de triagem garante que poucas crianças sadias sejam consideradas doentes.

---

\* N-1-Naftiletilenodiamino diidrocloreto.

O estudo realizado não tem a pretensão de estabelecer os valores normais na população, pois estes já haviam sido devidamente estabelecidos nos estudos coordenados por WOLF et al. (1990a). Mas mesmos assim, tinha-se o dever de averiguar o padrão normal de adultos nesse meio. Os intervalos de “máximo” e “mínimo”, assim como a “média” e o “desvio padrão” se equivalem àqueles encontrados no estudo mencionado acima, em que 12 países contribuíram (WOLF et al., 1990a).

Diferente da literatura, que aponta a frequência com que os prematuros aparecem na lista de falso-positivos e descrição das deficiências transitórias, a população de prematuros não foi identificada neste estudo, pois não havia parâmetros para isso. Ao conferir os dados que constam no cartão de identificação do paciente (anexo 1), nota-se que só é requisitado o peso não havendo avaliação da idade gestacional, ainda assim muitos vinham incompletos com relação a este item. Somente com o dado referente ao peso do recém-nascido não se pode inferir sobre a idade gestacional.

Além disso, muitos dos prematuros ao nascer exigem cuidados intensivos, mesmo que temporariamente, fazendo com que o “teste do pezinho” seja colhido no período em que a deficiência transitória já esteja normalizada. Este período é de dez dias para prematuros de 34 a 36 semanas, e de em média 20 dias para idade gestacional inferior a 34 semanas (SUORMALA et al., 1988).

O tratamento para deficiência de biotinidase consiste na administração de biotina via oral, não sendo necessário qualquer tipo de dieta especial. Geralmente consegue-se tal medicação por manipulação nas farmácias, e a apresentação conhecida é a cápsula. Os pacientes que foram identificados pelo programa informaram um gasto de US\$ 8,00 a US\$ 12,00 ao mês.

Para implantação do programa e realização de 125.000 testes, gastou-se em torno de US\$ 8.430,00. Os itens específicos relevantes ao projeto estão divididos em equipamentos, reagentes e serviços como telefonia e correio. Não se levou em consideração recursos humanos, uma vez que só havia um profissional responsável por

todas as etapas da pesquisa, e que foi a autora deste trabalho. O cálculo do custo por exame realizado foi de aproximadamente US\$ 0,07, comparando-se com o custo de outros exames tais como para o hipotireoidismo congênito e para fenilcetonúria - de aproximadamente US\$ 4,00 - percebe-se que o teste de triagem para deficiência de biotinidase é menos dispendioso.

O programa de “screening” neonatal para deficiência de biotinidase, pelo fato de utilizar a mesma amostra sanguínea processada para os testes já aceitos na rotina, não requer procedimentos especiais para sua obtenção. Neste caso, outra grande vantagem do teste é que este deverá ser simplesmente incorporado ao programa já existente.

## 7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 7.1 CONCLUSÕES

- A frequência da deficiência de biotinidase no Estado do Paraná corresponde àquela relatada na literatura, mesmo com a inferência de ter sido subestimada.
- O teste colorimétrico de triagem idealizado para detecção precoce da doença é de fácil execução e tem a vantagem de poder ser incorporado ao programa já existente para detecção de hipotireoidismo congênito e fenilcetonúria.
- A especificidade de 99,88% sugere que o procedimento metodológico é efetivo em detectar os casos de deficiência de biotinidase.
- O baixo custo e a efetividade do exame favorecem a relação custo/benefício que foi considerada satisfatória.
- Os fatos acima listados justificam a inclusão da deficiência de biotinidase no programa de “screening” neonatal paranaense.

## 7.2 SUGESTÕES

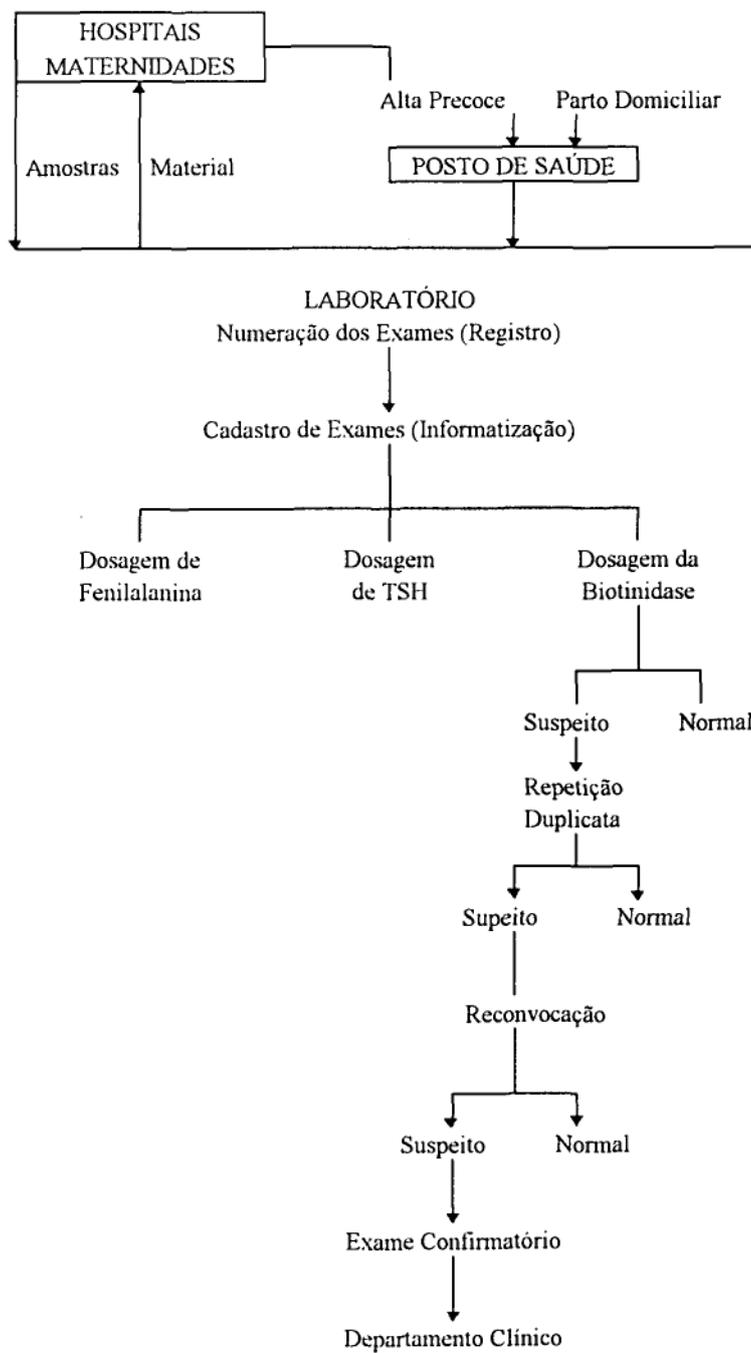
- Estudo das famílias das crianças encontradas pelo programa de “screening” neonatal para deficiência de biotinidase, com objetivo de detectar outros casos ou heterozigotos para a doença.
- Pesquisar a frequência da deficiência de biotinidase entre os grupos que exibem sintomas compatíveis com distúrbios no metabolismo da biotina. Quais sejam: dermatites, alopecia, epilepsia refratária, deficiência mental, imunodeprimidos, distúrbios respiratórios (ex: estridor laríngeo) entre outros.
- Investigar os casos de deficiência adquirida de biotinidase nos pacientes portadores de insuficiência hepática crônica, correlacionando-os com os achados clínicos e bioquímicos, assim como com a resposta ao tratamento com biotina.

**ANEXO 1 - MAPA DO ESTADO DO PARANÁ  
COM AS INSTITUIÇÕES CONVE-  
NIADAS ASSINALADAS**



**ANEXO 2 - FLUXOGRAMA**

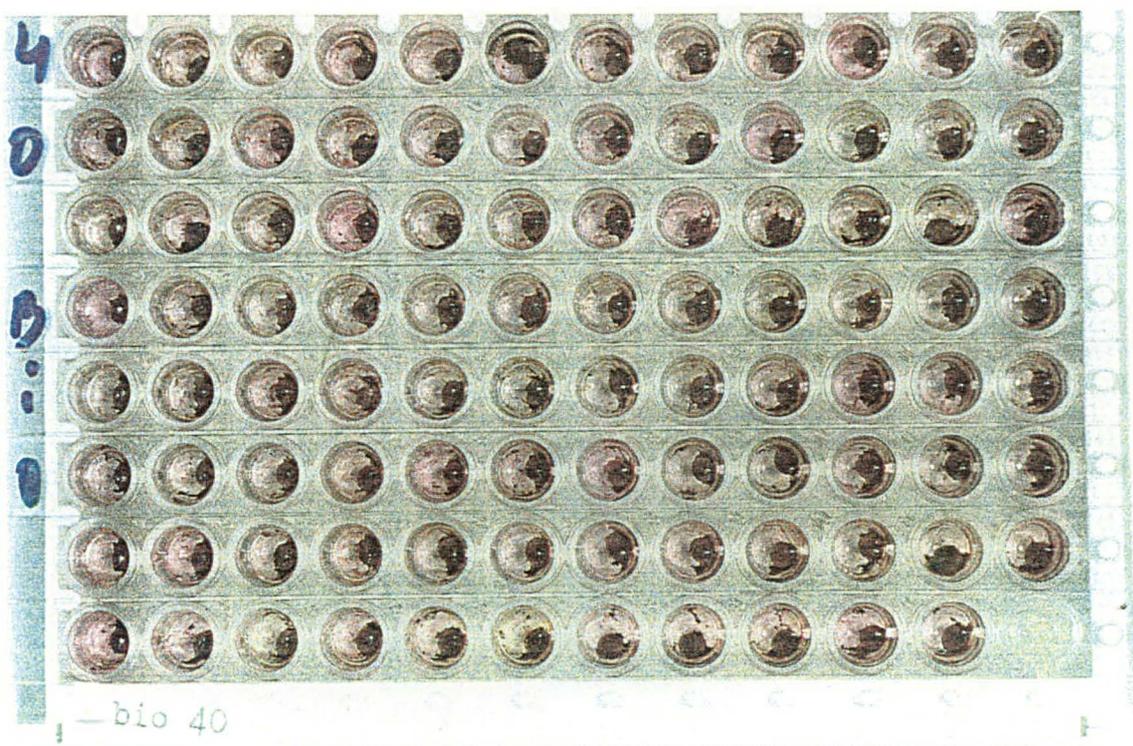
## FLUXOGRAMA



### **ANEXO 3 - CARTÃO DE COLETA DE EXAME**



**ANEXO 4 - PLACA DEMONSTRATIVA  
DE EXAMES NORMAIS**



## **ANEXO 5 - CURVA DE CONCENTRAÇÃO DO PABA**

gráfico

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANGER, H.; LORENTZ, K.; COBET, G. Der biotinidasemangel - eine progrediente stoffwechsel - erkrankung des kindesalter mil krampfanfällen und ataxie. **Psychiatrie, Neurologie und Medizinische Psychologie**, Leipzig, v.42, p.163-166, 1990.
- 2 BAUMGARTNER, E.R.; SUORMALA, T.M.; WICK, H. Biotin-responsive multiple carboxylase deficiency (MCD) : deficient biotinidase activity associated with renal loss of biotin. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.7, supl.2, p.123-125, 1984.
- 3 \_\_\_\_\_. et al. Biotinidase deficiency : a cause of subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh Syndrome). Report of a case with lethal Outcome. **Pediatric Research**, Baltimore, v.26, n.3, p.260-266, p.1989.
- 4 BOUSOUNIS, D.P.; CAMFIELD, P.R.; WOLF, B. Reversal of brain atrophy with biotin treatment in biotinidase deficiency. **Neuropediatrics**, Stuttgart, v.24, p.214-217, 1993.
- 5 BRASIL. Lei Federal nº 8069, de 13 de julho de 1990. Proceder a exame ao diagnóstico e terapêutica de anormalidade no metabolismo do recém-nascido, bem como prestar orientação aos pais. **Do Estatuto da Criança, do Direito à Vida e à Saúde**.
- 6 BURLINA, A.B.; SHERWOOD, W.G.; MARCHIORO, M.V. et al. Neonatal screening for biotinidase deficiency in north eastern Italy. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v.147, p.317-318, 1988.
- 7 BURTON, B.K.; ROACH, E.S.; WOLF, B. Sudden death associated with biotinidase deficiency. **Pediatrics**, Evanston, v.79, n.3, p.484-483, 1987.
- 8 CAMPBELL, P.N.; SMITH, A.P. Coenzymes. In: \_\_\_\_\_. **Biochimie illustrée**. Paris : Editora Massom, 1982. p.127-169.
- 9 CHARLES, B.M.; HOSKING, G.; GREEN, A. et al. Biotin-responsive alopecia and developmental regression. **The Lancet**, Londres, p.118-120, 1979.
- 10 CHAUNHAN, J.; DAKSHINMURTI, K. Purification and characterization of human serum biotinidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.261, n.9, p.4268-4275, 1986.
- 11 DE PARSCAU, L.; BEAUFRÈRE, B.; VIANEY-LIAUD, C. et al. Le déficit en biotinidase : une maladie à expression neurologique et cutanée sensible à la biotine. **Pediatrie**, Bucuresti, v.44, p.383-386, 1989.
- 12 DIAMANTOPOULOS, N.; MICHAEL, PAINTER, M.J.; WOLF, B. et al. Biotinidase deficiency : accumulation of lactate in the brain and response to physiologic doses of biotin. **Neurology**, Cleveland, v.36, p.1107-1109, 1986.
- 13 DIONISI-VICI, C.; BACHAMANN, C.; GRAZIANI, M.C. et al. Laryngeal stridor as a leading symptom in a biotinidase-deficient patient. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.11, p.313-313, 1988.

- 14 DUNKEL, G.; SCRIVER, C.R.; CLOW, C.L. et al. Prospective ascertainment of complete and partial serum biotinidase deficiency in the newborn. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.12, p.131-138, 1989.
- 15 FLETCHER, R.H. 1989(a); FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. Diagnóstico. In: \_\_\_\_\_. **Epidemiologia clínica. Bases científicas da conduta médica.** Porto Alegre : Artes Médicas. p.68-107.
- 16 \_\_\_\_\_(b). Frequência. In: \_\_\_\_\_. **Epidemiologia clínica. Bases científicas da conduta médica.** Porto Alegre : Artes Médicas. p.108-125.
- 17 FOX, J.G. Experience of the Manitoba perinatal screening program, 1965-85. **CMAJ**, Manitoba, v.137, p.883-888, 1987.
- 18 GRETER, J.; HOLME, E.; LINDSTEDT, S. et al. Biotin-responsive 3-Methylcrotonylglycinuria with biotinidase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.8, supl. 2, p.103-104, 1985.
- 19 GUTHRIE, R. The origin of newborn screening. **Screening**, Texas, v.1, p.5-15, 1992.
- 20 HAVASS, Z. Neonatal screening for biotinidase deficiency in East Hungary. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.14, p.928-931, 1991
- 21 HAYAKAWA, K.; OIZUMI, J. Determination of biotinidase activity by liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.383, p.148-152, 1986.
- 22 HEARD, G.S.; McVOY, J.R.; WOLF, B. A screening method for biotinidase deficiency in newborns. **Clinical Chemistry**, Washington, v.30, n.1, p.125-127, 1984.
- 23 HEARD, G.S.; WOLF, B.; JEFFERSON, L.G. et al. Neonatal screening for biotinidase deficiency : results of a 1 - year pilot study. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v.108, p.40-46, 1986.
- 24 HOEL, P.G. Descrição de dados amostrais. In: \_\_\_\_\_. **Estatística elementar.** São Paulo : Editora Atlas, 1981. p.27-36.
- 25 HONAVAR, M.; JANOTA, I.; NEVILLE, B.G.R. et al. Neuropathology of biotinidase deficiency. **Acta Neuropathologica**, Berlim, v. 84, p.461-464, 1992.
- 26 HURVITZ, H.; GINAT-ISRAELI, T.; ELPELEG, O.N. et al. Biotinidase deficiency associated with severe combined immunodeficiency. **The Lancet**, Londres, 1989.
- 27 INTERNATIONAL SCREENING SYMPOSIUM OF INBORN ERROS OF METABOLISM (1988, São Paulo). **Screening for biotinidase deficiency in the province of Quebec.** São Paulo : APAE, 1988.
- 28 KALAYCI, Ö.; COSKUN, T.; TOKATTI, A. et al. Infantile spasms as the initial symptom of biotinidase deficiency. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v.124, n.1, p.103-104, 1994.
- 29 KENNEDY, R.; GIRDWOOD, R.W.A.; KING, M.D. Neonatal screening for biotinidase deficiency. A pilot study in Scotland. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.12, p.344-345, 1989.

- 30 LAWLER, M.G.; FREDERICK, D.L.; RODRIGUEZ-ANZA, S. et al. Newborn screening for biotinidase deficiency : pilot study and follow-up of identified cases. **Screening, Texas**, v.1, p.37-47, 1992.
- 31 LEHNINGER, A.L. Vitaminas e microelementos na função de enzimas. In: \_\_\_\_\_. **Princípios de bioquímica**. São Paulo : Editora Sarvier, 1993. p.185-202.
- 32 LEVY, H.L. Screening of the newborn. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v.12, n.9, p.111-119, 1993.
- 33 LIKURA, Y.; ODAJIMA, Y.; NAGAKURA, T. et al. Oral biotin treatment is effective for atopic dermatitis in children with low biotinidase activity. **Acta Paediatrica Scandinavica**, Oslo, v.77, p.762-763, 1988.
- 34 MARANDIAN, M.H.; SOLTANABADI, A.; LESSANI, M. et al. Déficit en biotinidase : maladie à manifestations principalement neuro-cutanées curable par la biotine. **Annales de Pédiatrie**, Paris, v.34, n.9, p.725-728, 1987.
- 35 MAYES, P.A. Structure and function of the water soluble vitamins. In: MURRAY, R.K.; MAYES, P.A.; GRANNER, D.K. et al. **Harper's Biochemistry**. Connecticut : Editora Appleton & Lange, cap.3, 1990. p.553-555.
- 36 McVOY, J.R.S; LEVY, H.L.; LAWLER, M. et al. Partial biotinidase deficiency: clinical and biochemical features. **The journal of pediatrics**, St. Louis, v.116, n.1, p.78-83, 1990.
- 37 MITCHELL, G.; OGIER, H.; MUNNICH, A. et al. Neurological deterioration and lactic acidemia in biotinidase deficiency : a treatable condition mimicking leigh's disease. **Neuropediatrics**, Stuttgart, v.17, p.129-131, 1986.
- 38 MUNNICH, A.; SAUDUBRAY, J.M.; COUDE, F.X. et al. Fatty-acid-responsive alopecia in multiple carboxylase deficiency. **Lancet**, Londres, p.1080-1081, 1980.
- 39 NAGAMINE, T.; SAITO, S.; YAMADA, S. et al. Biotinidase activity in patients with liver disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v.28, p.899-906, 1993.
- 40 NYHAN, W.L. Inborn errors of biotin metabolism. **Archives of Dermatology**, Chicago, v.123, p.1696-1698, 1987.
- 41 \_\_\_\_\_. Multiple carboxylase deficiency. **International Journal of Biochemistry**, Oxford, v.20, n.4, p.363-370, 1988.
- 42 OGIER, H.; AICARDI, J. Metabolic disease. In: AICARDI, J. **Diseases of the nervous system in childhood**, Oxford : Blacwell Scientific Publications Ltd.,1992. p.459.
- 43 PARANÁ. Lei Estadual nº 8627, de 9 de dezembro de 1987, artigo 1º. É obrigatória a realização de provas para o diagnóstico precoce de fenilcetonúria, do hipotireoidismo, do mongolismo e outras má-formações genéticas cromossômicas em todas as crianças nascidas nas maternidades e casas hospitalares, mantidas pelo Estado do Paraná.

- 44 RAMACKERS, V.T.; BRAB, M.; RAU, G. Recovery from neurological deficits following biotin treatment in a biotinidase Km variant. **Neuropediatrics**, Stuttgart, v.24, p.98-102, 1993.
- 45 RAMACKERS, V.T.; SUORMALA, T.M.; BRAB, M. et al. A biotinidase Km variant causing late onset bilateral optic neuropathy. **Archives of Disease in Childhood**, Londres, v.67, p.115-119, 1992.
- 46 RIUDOR, E.; VILASECA, M.A.; BRIONES, P. et al. Requirement of high biotin doses in a case of biotinidase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v. 12, p.338-339, 1989.
- 47 RYBAK, L.P.; WHITWORTH, C.; WEBERG, A.D. Rat as potential model for rearing loss in biotinidase deficiency. **Annals of Otolaryngology and Rhinology and Laryngology**, St. Louis, v.100, p.294-300, 1991.
- 48 SALBERT, B.A.(a); PELLOCK, J.M.; WOLF, B. Characterization of seizures associated with biotinidase deficiency. **Neurology**, Cleveland, v.43, p.1351-1355, 1993.
- 49 SALBERT, B.A.(b); ASTRUC, J.; WOLF, B. Ophthalmologic findings in biotinidase deficiency. **Ophthalmologica**, Basel, v.206, p.177-181, 1993.
- 50 SCHULZ, P.E.; WEINER, S.P.; BELMONT, J.W. et al. Basal ganglia calcifications in a case of biotinidase deficiency. **Neurology**, Cleveland, v.38, p.1326-1328, 1988.
- 51 SCHWEITZER, S.; DIEPENBROCK, F.; SUORMALA, T. et al. Newborn screening for biotinidase deficiency in lower saxony. **Infant Screening**, Texas, v.17, n.2, p.8, 1994.
- 52 STEVENS, M.B.; RIGILANO, J.C.; WILSON, C.C. State screening for metabolic disorders in newborns. **AFP**, Maryland, v.37, n.4, p.223-228, 1988.
- 53 SUCHY, S.F.; Mc VOY, J.S.; WOLF, B. Neurologic symptoms of biotinidase deficiency : possible explanation. **Neurology**, Cleveland, v.35, p.1510-1511, 1985.
- 54 SUORMALA, T.M.; BAUMGARTNER, E.R.; WICK, H. et al. Comparison of patients with complete and partial biotinidase deficiency: biochemical studies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.13, p.76-92, 1990.
- 55 SUORMALA, T.M.; WICK, H.; BAUMGARTNER, E.R. Low biotinidase activity in plasma of some preterm infants : possible source of false-positive screening results. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.147, p.478-480, 1988.
- 56 SUTHERLAND, S.J.; OLSEN, R.D.; MICHELS, V. et al. Screening for biotinidase deficiency in children with unexplained neurologic or developmental abnormalities. **Clinical Pediatrics**, Cleveland, v.30, n.2, p.81-84, 1991.
- 57 SWICK, H.M.; KIEN, L. Biotin deficiency with neurologic and cutaneous manifestations but without organic aciduria. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v.103, n.2, p.265-267, 1983.
- 58 TAITZ, L.S.; GREEN, A.; STRACHAN, I. et al. Biotinidase deficiency and the eye and ear. **Lancet**, Londres, p.918, 1983.

- 59 THERREL, B.L. National Screening Status Report. **Infant Screening, Texas**, v.16, n.1, 1993.
- 60 THERRELL, B.L.; PANNY, S.R.; DAVIDSON, A. et al. U.S. newborn screening system guidelines : statement of the council of regional networks for genetic services. **Screening, Texas**, v.1, p.135-147, 1992.
- 61 THOENE, J.; BAKER, H.; YOSHINO, M. et al. Biotin-responsive carboxylase deficiency associated with subnormal plasma and urinary biotin. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.304, n.14, p.817-822, 1981.
- 62 TIWARY, C.M. Proposed guidelines for screening of metabolic and endocrine diseases of dependent neonates of the U.S. Armed Forces. **Clinical Pediatrics**, Cleveland, v.26, n.7, p.349-352, 1987.
- 63 TOKATLI, A.; COSKUM, T.; ÖZALP, I. et al. The major presenting symptom in a biotinidase-deficient patient : Laryngeal stridor. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.15, p.281-282, 1992.
- 64 WEISSBECKER, K.A.; WOLF, B.; EAVES, L.J. et al. Combined pedigree and twin family study to determine the sources of variation in serum biotinidase activity : the usefulness of multiple study designs. **American Journal of Medical Genetics**, Nova Iorque, v.47, p.231-240, 1993.
- 65 WIDHALM, K. 25 Jahre österreichisches screening-programm für angeborene stoffwechsellamalien an der universitätsklinik. **Wien Klin Wochenschr**, Viena, v.104, n.16, p.510-513, 1992.
- 66 WOLF, B.(a); GRIER, R.E.; ALLEN, R.J. et al. Phenotypic variation in biotinidase deficiency. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v.103, n.2, p.233-237, 1983.
- 67 WOLF, B.(b); GRIER, R.E.; HEARD, G.S. Hearing loss in biotinidase deficiency. **The Lancet**, Londres, p.1365-1366, 1983.
- 68 WOLF, B.(c); GRIER, R.E.; ALLEN, R.J. et al. Biotinidase deficiency : the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. **Clínica Chimica Acta**, Amsterdam, v.131, p.273-281, 1983.
- 69 WOLF, B.; HEARD, G.S.; SECOR, J.R. et al. Biotinidase deficiency : the possible role of biotinidase in the processing of dietary protein-bound biotin. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.7, supl.2, p.121-122, 1984.
- 70 WOLF, B.; HEARD, G.S.; JEFFERSON, L.G. et al. Clinical findings in four children with biotinidase deficiency detected through a statewide neonatal screening program. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.313, n.1, p.16-19, 1985.
- 71 WOLF, B.; HEART, G.S.; JEFFERSON, L.G. et al. Neonatal screening for biotinidase deficiency : an update. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.9, supl.2, p.303-306, 1986.
- 72 WOLF, B.(a); HEARD, G.S. Screening for biotinidase deficiency in newborns : worldwide experience. **Pediatrics**, Evanston, v.85, n.4, 1990.
- 73 WOLF, B.(b); HYMES, J.; HEARD, G.S. Biotinidase. **Methods in Enzymology**, Nova Iorque, v.184, p.103-111, 1990.

- 74 WOLF, B.(a); HEARD, G.S. Biotinidase deficiency. **Advances in Pediatrics**, Chicago, v.38, p.1-21, 1991.
- 75 WOLF, B. (b). Worldwide survey of neonatal screening for biotinidase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Netherlands, v.14, p.923-927, 1991.
- 76 WOLF, B.; HEARD, G.S. Disorders of biotin metabolism. In: STANBURRY J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S. **The metabolic bases of** USA : McGraw Hill Book Company, 1994. p.2083-2103.