



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

LÍVIA DO VALE TEIXEIRA DA COSTA

TRIAGEM NEONATAL PARA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE EM
RECÉM-NASCIDOS NA FUNDAÇÃO SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DO PARÁ

BELÉM
2009

LÍVIA DO VALE TEIXEIRA DA COSTA

TRIAGEM NEONATAL PARA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE EM
RECÉM-NASCIDOS NA FUNDAÇÃO SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DO PARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

BELÉM
2009

LÍVIA DO VALE TEIXEIRA DA COSTA

TRIAGEM NEONATAL PARA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE EM
RECÉM-NASCIDOS NA FUNDAÇÃO SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DO PARÁ

Belém - PA, 07 de dezembro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
ICB - UFPA
(Orientador)

Prof. Dr^a Rita de Cássia Mousinho Ribeiro
ICB - UFPA

Profa. MsC. Isabel Cristina Neves de Souza
ICS - UFPA

Prof. Roseani da Silva Andrade - Suplente
ICB - UFPA

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido, não na vitória propriamente dita.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar pelo caminho certo, além de ter me proporcionado a capacidade de pensar e construir o conhecimento com sabedoria;

Aos meus pais, Ray do Vale e Geraldo Teixeira, por sempre me apoiarem nos meus sonhos, pelo amor incondicional, e por me ensinarem a ser uma pessoa de bem;

À minha família, de um modo geral, pois todos estiveram sempre presentes na minha vida, e foram essenciais na formação do meu caráter;

Ao meu namorado Nelson Hernán, por ter sido um grande companheiro nesse momento tão importante da minha vida, pois soube ser paciente e me ajudar a vencer mais essa etapa;

Ao professor Luis Carlos Santana, por colaborar no meu crescimento profissional, pois ele soube manter sua autoridade e ser amigo ao mesmo tempo;

Ao Dr. Benedito Maués, médico responsável pelo setor de neonatologia da Fundação Santa Casa de Misericórdia, por permitir as coletas nos recém-nascidos, além de auxiliar quando surgiam dificuldades;

À amiga Fernanda Sassim, por estar disposta a me auxiliar nas numerosas coletas de amostras de sangue, além da realização das técnicas;

Aos inúmeros companheiros do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, grandes amigos pra todas as horas, e sempre dispostos a ajudar em quaisquer dificuldades;

Aos meus amigos de curso, uma vez que os mesmos me proporcionaram muitas alegrias durante esses 4 anos, além de terem vivido muitas experiências e dificuldades que só nós, futuros biomédicos, sabemos.

RESUMO

Com o surgimento da triagem neonatal, tornou-se possível identificar precocemente diversas doenças congênitas, já que elas são, majoritariamente, assintomáticas no período neonatal. No Brasil, o diagnóstico da Deficiência de Biotinidase é feito somente por serviços particulares, exceto no Estado do Paraná, os quais tem custos relativamente elevados para o teste. A Deficiência de Biotinidase é uma doença metabólica, de herança autossômica recessiva, a qual provoca falhas no metabolismo da biotina. Como consequência, ocorre uma depleção da biotina endógena devido à incapacidade do organismo em fazer a sua reciclagem ou de usar a biotina ligada à proteínas fornecida pela dieta. A deficiência de biotinidase preenche todos os critérios para ser incluída na triagem neonatal (teste do pezinho). Este trabalho visa à implantação de um Programa de Triagem Neonatal para Deficiência de Biotinidase no Estado do Pará a partir da análise da biotinidase em neonatos nascidos na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCM-PA). No período de junho a outubro do ano de 2009 foram analisadas 217 amostras de sangue de neonatos da FSCM-PA coletadas em papel filtro. A atividade da biotinidase foi avaliada através do ensaio colorimétrico qualitativo, no qual a intensidade da cor da reação ocorrida no papel filtro expressou o resultado. No presente estudo não houve positividade confirmada para a Deficiência de Biotinidase, uma vez que houve um padrão de cor púrpura nas amostras, demonstrando atividade enzimática normal. Sugere-se um provável caso de Deficiência de Biotinidase, o qual ainda deve ser confirmado pela análise quantitativa da enzima em uma nova amostra. Por ser de diagnóstico clínico complicado, e confirmado apenas com a análise bioquímica, os indivíduos com Deficiência de Biotinidase, geralmente, não são identificados como tais, levando a uma progressão perigosa da doença.

Palavras-chave: Triagem Neonatal, Deficiência de Biotinidase, Biotina.

ABSTRACT

With the advent of neonatal screening, it became possible to identify several congenital diseases early, since they are mostly asymptomatic in the neonatal period. In Brazil, the diagnosis of Biotinidase Deficiency is made only for specific services, except in the State of Paraná, which has relatively high costs for the test. Biotinidase Deficiency is a metabolic disease, autosomal recessive, which causes failures in the metabolism of biotin. As a result, there is a depletion of endogenous biotin due to the inability of the body to make their recycling or use the biotin linked to proteins supplied by the diet. Biotinidase deficiency satisfies all the criteria to be included in neonatal screening (Guthrie test). This work aims to implement a program of neonatal screening for biotinidase deficiency in Pará from the analysis of biotinidase in neonates born at the Santa Casa de Misericórdia do Para (FSCM-PA). In the period from June to October of 2009 were analyzed 217 blood samples from newborns of FSCM-PA collected on filter paper. The biotinidase activity was assessed by colorimetric qualitative test in which the color intensity of the reaction occurred in the filter paper expressed the result. In this study there was no confirmed positive for Biotinidase Deficiency, since there was a pattern of purple in the samples, showing normal enzyme activity. Suggest a probable case of Biotinidase Deficiency, which still must be confirmed by quantitative analysis of the enzyme in a new sample. Because the clinical diagnosis difficult, and just confirmed with biochemical analysis, individuals with Biotinidase Deficiency usually are not identified as such, leading to a dangerous progression of the disease.

Keywords: Screening Neonatal, Biotinidase Deficiency, Biotin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 TRIAGEM NEONATAL	1
1.2 HISTÓRICO DA TRIAGEM NEONATAL	4
1.3. DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE	4
1.4. BIOTINIDASE	8
1.5. BIOTINA	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 GRUPO DE ESTUDO	15
3.2 COLETA, CONSERVAÇÃO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS	15
3.3 ASPECTOS ÉTICOS	16
3.4. ANÁLISES LABORATORIAIS	17
3.4.1 Análise colorimétrica qualitativa da enzima biotinidase	17
3.4.2 Análise colorimétrica quantitativa (em papel-filtro) da enzima biotinidase	18
3.4.3 Análise colorimétrica quantitativa (em soro/plasma) da enzima biotinidase	19
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	21
4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS	22
4.3 CLASSIFICAÇÃO QUANTO À INTENSIDADE DA COLORAÇÃO	23
4.4 INTERFERENTES NA ATIVIDADE DA BIOTINIDASE	26
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
5. CONCLUSÕES	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

7. ANEXOS	35
7.1 ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ	35
7.2 ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	36
7.3 ANEXO 3 - FOLDER EXPLICATIVO (DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE)	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRIAGEM NEONATAL

Há algumas décadas atrás, crianças nascidas com distúrbios metabólicos não tinham chance de sobrevivência. O surgimento da triagem neonatal alterou este quadro, permitindo a aplicação de ações preventivas em relação ao diagnóstico de doenças congênitas ou infecciosas. Com o advento da triagem neonatal, tornou-se possível identificar precocemente essas desordens, já que elas são, em sua maioria, assintomáticas no período neonatal, podendo-se inferir um tratamento adequado, a fim de diminuir ou impedir o surgimento das seqüelas associadas às doenças (Souza *et al.*, 2002; Ministério da Saúde, 2008).

A triagem neonatal, fornecida pelos centros de saúde, é realizada por meio de punção no calcanhar do recém-nascido, sendo por isso, popularmente conhecida como “Teste do Pezinho”.

Dentre as patologias que podem ser analisadas na triagem neonatal, estão Fenilcetonúria (PKU), Hipotireoidismo congênito (HC), Anemia falciforme e outras hemoglobinopatias, Hiperplasia adrenal congênita, Fibrose cística (FC), Galactosemia, Deficiência de Biotinidase, Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), Toxoplasmose congênita, Sífilis congênita, Citomegalovirose congênita, Doença de Chagas congênita, Rubéola congênita, SIDA congênita, Deficiência de MCAD (Desidrogenase de acil-CoA de cadeia média) (Ministério da Saúde, 2008).

O Programa Nacional de Triagem Neonatal - PNTN foi criado através da Portaria GM/MS nº 822, de 6 de junho de 2001, e tem como objetivo a realização da triagem neonatal em 100% dos nascidos vivos, a busca ativa dos pacientes triados, a confirmação do diagnóstico laboratorial, além do acompanhamento e tratamento adequados dos pacientes identificados como portadores das doenças.

Segundo Ramalho e colaboradores (2002), a regulamentação garante acesso ao serviço de triagem neonatal a todos os recém-nascidos brasileiros, sem

distinção de raça, origem geográfica ou classe socioeconômica, e assume grande importância em um dos fundamentos da Ética Médica, que é o da igualdade.

O PNTN abrange apenas quatro patologias: Fenilcetonúria (PKU), Hipotireoidismo Congênito, Hemoglobinopatias e Fibrose Cística. Os exames realizados em cada Estado serão aqueles para os quais os mesmos estão habilitados a fazer, conforme as fases de implantação estabelecidas pelo Ministério da Saúde, a saber: a) Fase I: Hipotireoidismo congênito e fenilcetonúria; b) Fase II: Hipotireoidismo congênito, fenilcetonúria e hemoglobinopatias; e c) Fase III: Hipotireoidismo congênito, fenilcetonúria, hemoglobinopatias e fibrose cística (Figura 01).



Figura 01: Mapa representativo das fases do PNTN por Estado (Adaptado de Ministério da Saúde, 2008).

A análise da Deficiência de Biotinidase só é realizada em serviços de triagem neonatal particulares no Brasil, exceto no Estado do Paraná, no qual o serviço público de saúde oferece o teste gratuitamente à população (Pinto *et al.*, 1998). Isso acaba por excluir grande parte da população, o que limita o diagnóstico dessa patologia em hospitais públicos, contrariando o fundamento de igualdade proposto pela Ética Médica.

Para a inclusão em testes de triagem, o distúrbio deve seguir alguns pré-requisitos importantes, já que, principalmente na rede pública, os recursos são mais restritos. Primeiramente, a doença deve causar conseqüências danosas e graves para a saúde do afetado se não tratada; em segundo lugar, é necessário que haja um tratamento adequado e que possa modificar o curso da doença; este tratamento tem que ser mais eficaz se implantado na fase pré-clínica da doença; e, por último, o teste de triagem deve ser simples e eficiente, podendo ser aplicado em larga escala, e com baixo custo (Souza *et al.*, 2002).

O teste não deve apresentar resultados falso-negativos, e o mínimo de resultados falso-positivos, isto é, possuir alta sensibilidade e especificidade para o rastreamento da doença, deve ser passível de automação, e capaz de ser realizado em amostras de sangue coletadas em papel-filtro (Clague & Thomas, 2002). A deficiência de biotinidase se inclui nesses pré-requisitos, aumentando a probabilidade de inclusão futura no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN).

Segundo Schwartz e colaboradores (2000), os testes na triagem neonatal podem ser qualitativos, semiquantitativos ou quantitativos. A primeira amostra de sangue em papel filtro deve ser coletada entre o 3º e o 7º dias de vida do recém-nascido, preferencialmente, visto que o momento para a coleta não deve ser inferior a 48 horas de alimentação protéica (amamentação) e nunca superior a 30 dias.

Caso haja alteração nos resultados dos testes, os mesmos são confirmados a partir de outra análise, utilizando uma segunda amostra de sangue total, soro ou urina. Se houver confirmação da doença, a criança é encaminhada para o tratamento ou para investigações em serviços de referência. É importante frisar que o Teste do Pezinho é apenas um teste de triagem, no qual um resultado alterado não implica diagnóstico definitivo, necessitando, dessa forma, de exames confirmatórios.

No presente trabalho foi realizada a triagem neonatal para a Deficiência de Biotinidase na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCM-PA), uma vez que este não é um teste realizado rotineiramente na instituição, a qual oferece serviços de saúde à rede pública. Neste sentido, esse estudo buscou revelar a grande importância da triagem para o diagnóstico de uma doença a qual representa graves conseqüências se não tratada.

1.2 HISTÓRICO DA TRIAGEM NEONATAL

O desenvolvimento da técnica de triagem neonatal teve início com os estudos de Guthrie, na década de 1960, que possibilitaram a criação de um método para dosar fenilalanina em amostras de sangue por meio de discos de papel-filtro, permitindo o diagnóstico da Fenilcetonúria. A técnica simplificou a coleta, o transporte e o manuseio das amostras no laboratório (Guthrie, 1992).

Em 1970, foi introduzida no Brasil uma versão simples do Teste do Pezinho, a qual identificava apenas a Fenilcetonúria e o Hipotireoidismo Congênito. Somente no ano de 1992 o teste de triagem neonatal se tornou obrigatório em todo o território nacional (Mattozo & Souza, 2005).

Após a implantação da triagem neonatal para Fenilcetonúria, outras doenças passaram a ser objeto de estudo para testes adicionais no mesmo papel-filtro, e hoje o uso da triagem neonatal permite a detecção de inúmeros distúrbios metabólicos, dentre eles, o hipotireoidismo congênito, a fibrose cística, as hemoglobinopatias e a hiperplasia adrenal congênita (França & Domingos, 2008).

1.3. DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE

A Deficiência de Biotinidase é um erro inato do metabolismo de herança autossômica recessiva, caracterizado por falhas na utilização e reciclagem da biotina, uma vitamina não produzida pelo organismo, obtida através da dieta alimentar, ou da reciclagem endógena. Este distúrbio metabólico é mais freqüente em populações com elevadas taxas de casamentos consangüíneos, devido ao aumento da homozigidade gerada pelos mesmos, aumentando, assim, a prevalência de doenças monogênicas recessivas (Navarro *et al.*, 2000; Neto *et al.*, 2004).

No caso de deficiência parcial da enzima, a mesma apresenta de 10 a 30% de sua atividade normal no soro, enquanto que na deficiência total, menos de 10% da atividade é detectada (Navarro *et al.*, 2000; Wolf, 2005). Sua incidência mundial,

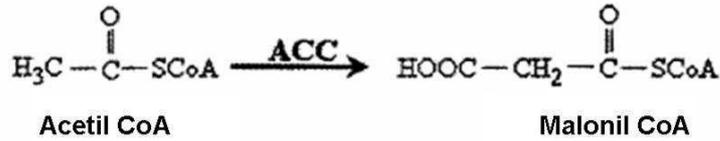
segundo Wolf & Heard (1990), é de 1:60.000 nascimentos. O estudo de Pinto (1998), realizado no Estado do Paraná, demonstrou freqüência de 1:62.500. Neto e colaboradores (2004) estimaram uma freqüência elevada no Brasil, em torno de 1:9.000. Até o presente momento, não há estudos de prevalência da deficiência de Biotinidase no Pará.

Os sintomas da deficiência de biotinidase são quase imperceptíveis nos recém-nascidos, e podem surgir quando as crianças se encontram entre a primeira semana de vida e os 2 anos de idade, estando os mesmos na média de cinco meses de vida (Pinto *et al.*, 1998). Os principais sintomas que caracterizam esse distúrbio são convulsões, ataxia, hipotonia, erupções cutâneas, alopecia, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, conjuntivite, problemas visuais, auditivos, respiratórios, bem como acidose cetolática, acidúria e acidemia orgânica (Hymes & Wolf, 1999; Wolf, 2005).

O início dos sintomas pode ser tardio já que, durante a gestação, o feto pode estocar biotina no fígado, por meio de gradiente transplacentário a seu favor, ou pelo fornecimento de biotina livre pela dieta no primeiro ano de vida, principalmente por fórmulas lácteas (o leite de vaca contém duas vezes mais biotina que o leite humano) (Bartlett *et al.*, 1985; González-Reyes & Marrero-González, 2002).

A consequente carência de biotina, devido à deficiência da enzima biotinidase, causa um aumento anormal na excreção urinária de diversos ácidos orgânicos característicos: (a) 3-metilcrotonilglicina e 3-hidroxiisovalerato (3HIA), em decorrência da deficiência da metilcrotonil-CoA carboxilase; (b) 3-hidroxipropionato (3HPA), propionilglicina, e metilcitrato, devido à carência da propionil-CoA carboxilase; e (c) lactato, por conta da deficiência da piruvato carboxilase (Mardach *et al.*, 2002) (Figura 02).

Citoplasma e Mitocôndria



Mitocôndria

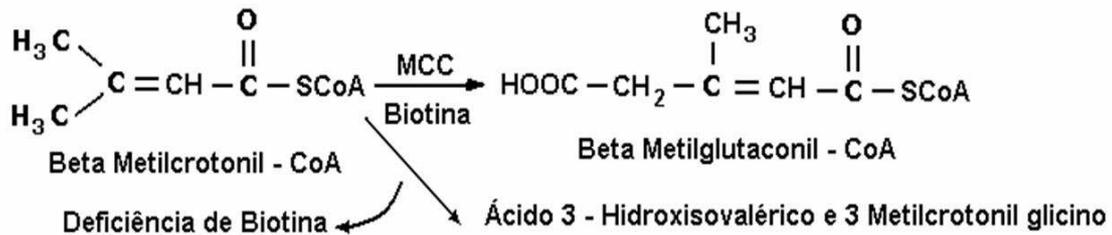
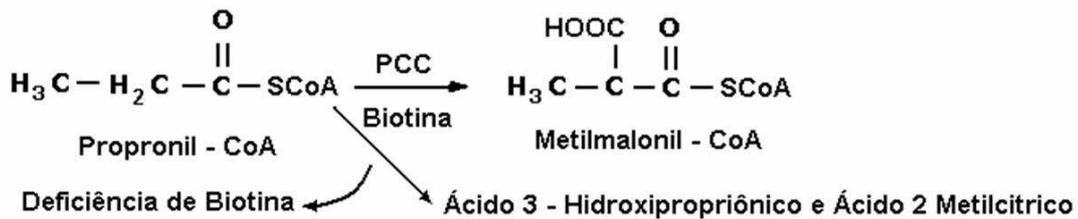
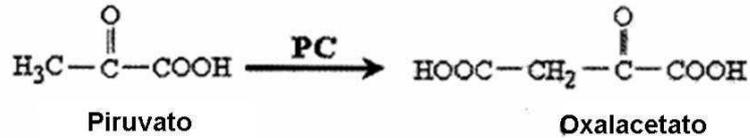


Figura 02: Carboxilases dependentes de Biotina. ACC: Acetil CoA carboxilase; PC: Piruvato Carboxilase; PCC: Propionil CoA carboxilase; MCC: 3-Metilcrotonil CoA carboxilase (Adaptado de Zempleni *et al.*, 2009)

Após o aparecimento dos sintomas, caso não haja tratamento adequado, o indivíduo com deficiência de biotinidase deve apresentar um quadro de piora constante, levando, inclusive, ao óbito (Neto *et al.*, 2004). Os indivíduos que apresentam deficiência parcial da enzima podem apresentar algumas das manifestações cutâneas da doença, mas não os sintomas neurológicos (Kaye, 2006).

Na Deficiência de Biotinidase a limitação da disponibilidade da biotina livre resulta em diminuição da atividade das carboxilases dependentes da biotina, uma

condição conhecida como Deficiência Múltipla de Carboxilases (DMC). Acredita-se que a deficiência de biotinidase possa ser a primeira falha bioquímica na Deficiência Múltipla de Carboxilases (Wolf & McVoy, 1983).

Na sua forma juvenil, a DMC é uma doença caracterizada por alopecia, convulsões, ataxia, e, algumas vezes, infecção por candidíase e atraso no desenvolvimento. Essa teoria é reforçada, visto que na DMC há uma deficiência das carboxilases dependentes de biotina, além de os níveis de biotinidase apresentarem-se, em média, de 0 a 3% da atividade normal (Wolf *et al.*, 1983).

O tratamento para a deficiência de biotinidase é bastante simples, de baixo custo e eficaz, fatores que favorecem a permanência do tratamento por mais tempo, diminuindo o número de abandonos e o, conseqüente, número de mortes por deficiência de biotinidase.

O tratamento deve ser precoce e baseado na suplementação oral de doses terapêuticas de biotina (5-20 mg por dia), resultando em melhora notável dos sintomas clínicos, bem como a prevenção de seqüelas neurológicas, caso o mesmo seja instaurado antes do aparecimento dos sintomas (Möslinger *et al.*, 2003).

Kimura e colaboradores (2003) relataram que, após o tratamento com biotina, a atividade da biotinidase pode ser melhorada, ou até normalizada. Porém, caso haja atraso no desenvolvimento, perda auditiva ou problemas visuais, o tratamento com biotina, geralmente, não é capaz de reverter o quadro de sintomas.

Por este motivo, é importante que se faça o diagnóstico precoce, a partir da triagem neonatal, evitando seqüelas relacionadas ao aparecimento dos sintomas da patologia (Hymes & Wolf, 1999).

1.4. BIOTINIDASE

A Biotinidase é uma enzima hidrolase, produzida principalmente no fígado, responsável pelo aproveitamento da Biotina provinda da dieta alimentar, ou pela reciclagem da mesma a partir de compostos intermediários. Esses processos podem ocorrer a partir da hidrólise da biotina ligada covalentemente a peptídeos, oriunda da alimentação ou de proteínas provenientes da digestão intestinal, ou pela clivagem da biocitina (biotinil-ε-lisina), que é a ligação entre um grupo carboxila da biotina e um grupo amino de um resíduo de lisina, resultante da degradação proteolítica das carboxilases (Broda *et al.*, 2001; Wolf *et al.*, 2002; Wolf, 2005).

Acreditava-se que a biotinidase possuísse somente a função de clivar a biocitina, promovendo, dessa maneira, a reciclagem da biotina. Estudos recentes sugerem que a biotinidase sérica exibe, também, a atividade de uma proteína carreadora de biotina, conservando a ligação da mesma como uma acilenzima, bem como uma biotinil transferase capaz de biotinilar proteínas específicas ou pequenas moléculas aceptoras. Sabendo que a biotinidase age como carreadora da biotina, acredita-se que esta enzima seja responsável por transportar a biotina para dentro das células através de um receptor de membrana (Wolf, 2005).

O fato de a concentração de biotinidase no soro ser bem maior do que a concentração de biotina reforçou a teoria de que a enzima agiria como carreadora de biotina. Um exemplo importante da função de carreadora é no caso das crianças com deficiência de biotinidase, as quais excretam a biotina livre na urina. Quando há a ligação entre a biotina e a biotinidase, forma-se um complexo grande e a vitamina não é excretada, evitando a diminuição no aporte de biotina dessas crianças (Hymes & Wolf, 1999).

A Biotina é largamente conhecida pela sua essencial função como coenzima das carboxilases dependentes de biotina. Recentemente surgiram fortes evidências de que a biotina exerce importantes funções na sinalização celular, regulação epigenética e na estrutura da cromatina, através da biotinilação das histonas (Zempleni *et al.*, 2009).

Wolf (2005) demonstrou que a biotinidase é expressa em alguns tecidos, além de demonstrar que a enzima ou as proteínas relacionadas a ela podem ser orientadas a várias regiões sub-celulares, inclusive o núcleo. Isso sugere que a biotinidase possui diversas funções, incluindo a regulação do papel da cromatina e do DNA, o que implica em possíveis esclarecimentos da relação genótipo/fenótipo da deficiência de biotinidase.

Outra função importante da biotinidase é a biotinição de histonas. Para ratificar essa afirmação, Hymes & Wolf (1999), promoveram um estudo a partir da incubação de histonas H2A do timo de bezerro na presença ou ausência de biocitina, com soro de indivíduos normais e indivíduos com deficiência total de biotinidase. Essas várias misturas foram submetidas à técnica de SDS-PAGE e as histonas biotiniladas foram detectadas pela avidina, a qual possui alta afinidade pela biotina. As histonas são biotiniladas quando incubadas com biocitina em soro normal, mas não em soro do indivíduo com deficiência de biotinidase, devido à ausência ou pouca expressão da enzima biotinidase.

As evidências das funções biológicas da biotinição de histonas são escassas, no entanto ela parece participar de alguns processos biológicos distintos. Há evidências de que a biotinição de histonas aumente em resposta à proliferação celular de linfócitos humanos, e também na fase G1 do ciclo celular, mantendo-se aumentada nas fases posteriores (fases S, G2 e M), o que pode auxiliar na resposta imune do indivíduo (Stanley *et al.*, 2001).

Sugere-se que biotinição das histonas se dê através de um mecanismo pelo qual a clivagem da biocitina (biotinil- ϵ -lisina) pela biotinidase leve à formação de um intermediário biotinil-tioester. Então, em um próximo passo da reação, a fração biotinil é transferida do grupamento tioester para o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina nas histonas. Acredita-se, também, que a biotinidase seja capaz de desbiotinilar as histonas (Hassan & Zemleni, 2006).

A biotinidase é expressa em diferentes tecidos e espécies, como em microorganismos, anfíbios, aves e mamíferos. Esta enzima apresenta alta atividade no soro, fígado, rins e glândulas adrenais, porém baixa atividade no encéfalo. Pelo fato

de sua maior concentração ser no soro, a maioria dos estudos é realizada a partir dessa fonte (González-Reyes & Marrero-González, 2002).

Cunha (2008) demonstrou que a atividade da biotinidase apresentou uma correlação direta significativa com a idade gestacional, ou seja, à medida que se aumenta o tempo de gestação, há um aumento na atividade enzimática.

Nos RN (a termo e prematuros), com níveis elevados de enzimas aminotransferases (TGO e TGP), a atividade da biotinidase revelou uma correlação negativa com esses elevados níveis. Assim, à medida que aumenta a atividade de TGO e TGP, ocorre uma diminuição na atividade da biotinidase. Nos RN (a termo e prematuro) os elevados níveis de bilirrubina total revelaram uma correlação negativa com a atividade da biotinidase, embora não tenha sido forte. Em função de estas variáveis poderem contribuir para o aparecimento de vários casos falso-positivos, é importante o acompanhamento clínico destes recém-nascidos (Schulpis *et al.*, 2003; Cunha, 2008).

Doenças hepáticas crônicas podem levar a um decréscimo na atividade sérica da enzima biotinidase, uma vez que o fígado é a principal fonte da mesma. Crianças com cirrose hepática descompensada e hepatite fulminante confirmaram o achado (Grier *et al.*, 1989; Pabuçcuoglu *et al.*, 2002; Abraham & Wilfred, 2003).

1.5. BIOTINA

A Biotina ($C_{10}H_{16}O_3N_2S$) é uma vitamina do complexo B, descoberta no ano de 1936 por Kogl e Tonis. A partir desse momento surgiu o interesse de pesquisá-la com o intuito de determinar sua função no metabolismo e/ou no curso de doenças (Hymes & Wolf, 1999). Essa vitamina tem a estrutura de um anel heterocíclico ligado a uma cadeia alifática lateral, a qual possui um grupo carboxila em sua porção terminal (Figura 03).

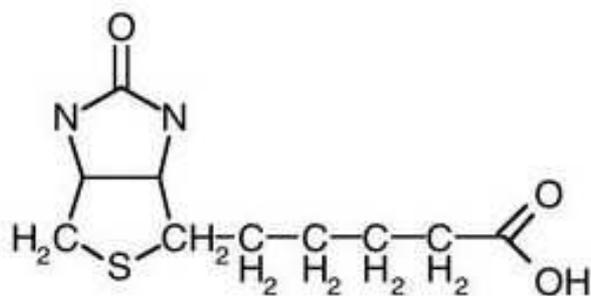


Figura 03: Estrutura molecular da biotina
(Adaptado de Chapman-Smith & Cronan Jr, 1999)

A Biotina apresenta 8 diferentes isômeros, dos quais somente a d-biotina apresenta

função de coenzima para processos de carboxilação. Diversas bactérias sintetizam a biotina, e em muitas plantas e tecidos animais uma pequena quantidade de biotina é encontrada (Wolf *et al.*, 1982).

A dose diária recomendada de biotina é de 35-50 µg para bebês, 65-200 µg para crianças e 100-200 µg para adultos (Subcommittee On The Ninth Edition Of The RDA, 1980; Chan & Bartlett, 1986).

A Biotina apresenta-se na forma de uma vitamina solúvel em água, a qual tem a função de coenzima para diversas enzimas, principalmente as carboxilases dependentes de biotina. Essa vitamina age como um vetor na transferência do grupo carboxila entre as moléculas que participam da reação de carboxilação (Pacheco-Alvarez *et al.*, 2002).

Nos humanos, a biotina é considerada um micronutriente essencial, o qual possui duas importantes funções celulares: (1) Age como coenzima para 4 (quatro) carboxilases dependentes de biotina: Acetil-CoA carboxilase [ACC; EC 6.4.1.21], encontrada no citoplasma celular e responsável pela síntese de ácidos graxos; Piruvato carboxilase [PC; EC 6.4.1.1], a qual inicia o processo de gliconeogênese e, assim como as demais carboxilases, é encontrada nas mitocôndrias; Propionil-CoA carboxilase [PCC; EC 6.4.1.2], que cataboliza os aminoácidos de cadeia ramificada valina, isoleucina, metionina e treonina, bem como a cadeia simples de ácidos graxos e a cadeia lateral do colesterol; e, por fim, a 3-metilcrotonil-CoA carboxilase [MCC;

EC 6.4.1.141], a qual catalisa o catabolismo da leucina (Wood & Barden, 1977; Wolf *et al.*, 1982; Chan & Bartlett., 1986; Pacheco-Alvarez *et al.*, 2000).

Esses mecanismos ocorrem no hepatócito, local onde a enzima holocarboxilase sintetase biotinila o grupo ϵ -amino de um resíduo lisil de cada uma das apocarboxilases, as quais são as formas inativas das carboxilases, no sentido de dar origem às holocarboxilases, ou seja, ativá-las para o exercício de suas funções metabólicas (Navarro *et al.*, 2000).

Quando covalentemente ligada ao sítio ativo dessas apocarboxilases, a biotina age como um carreador de dióxido de carbono nas reações de carboxilação (Straussberg *et al.*, 2000). Sugere-se que a biotina deve, também, exercer atividade em alguns eventos celulares em seres eucariotos, tais como regulação da transcrição e expressão de diversas proteínas (Figura 04) (Pacheco-Alvarez *et al.*, 2002).

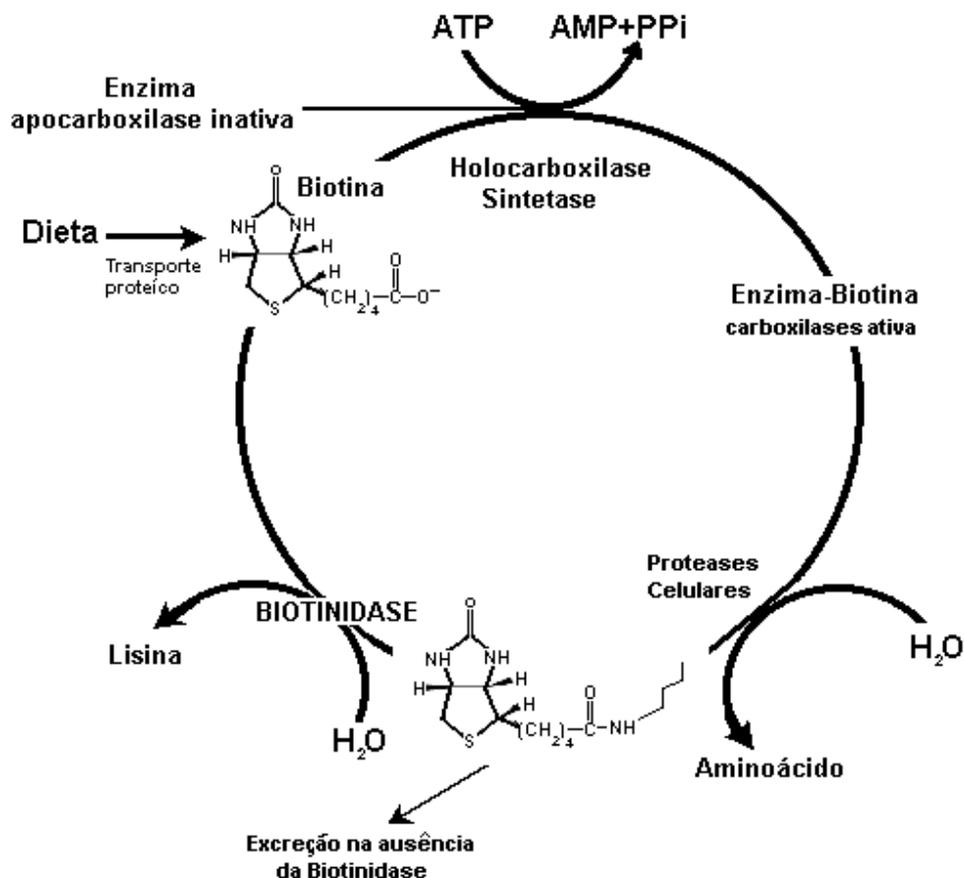


Figura 04: Rota Metabólica da Biotinidase
(Retirado de Pacheco-Alvarez, 2002.)

Outra importante função da biotina é a (2) regulação da expressão de diversas proteínas hepáticas, como a glicoquinase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e a maioria das proteínas envolvidas no metabolismo desta vitamina (Pérez-Monjaras *et al.*, 2008).

Com base nessas informações, observa-se a importante necessidade da biotina em seres superiores, os quais enfrentam uma ameaça constante para sua sobrevivência, uma vez que os mesmos são incapazes de produzir esta vitamina, a qual é sintetizada apenas por plantas e pela maioria dos seres procariotos (Chapman-Smith & Cronan Jr, 1999). A situação é ainda mais complicada ao considerar-se que há uma disponibilidade limitada de biotina na natureza, sendo que a maioria da mesma está ligada a proteínas, e não diretamente acessível, havendo a necessidade da clivagem pela enzima biotinidase.

Por ser de diagnóstico clínico complicado, os portadores da Deficiência de Biotinidase, geralmente, não são identificados como tais, levando a uma progressão perigosa da doença, a qual pode ser letal se não tratada. Por este motivo, a análise bioquímica dessa doença será de grande valia no diagnóstico e cura dessas crianças.

O impacto que causa a triagem neonatal de doenças tratáveis em saúde pública, assim como a necessidade de ampliar o número de doenças diagnosticáveis no período neonatal, permitindo a prevenção do retardo mental, motivaram a realização do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um projeto-piloto para a implantação de um Programa de Triagem Neonatal para Deficiência de Biotinidase no Estado do Pará a partir da análise desta enzima em neonatos nascidos na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, visto que o diagnóstico precoce é de extrema importância em caso de doenças congênitas assintomáticas em neonatos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1.** Empregar a análise qualitativa da enzima biotinidase em amostras de sangue em papel filtro de neonatos da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará;
- 2.2.2.** Empregar a análise quantitativa da enzima biotinidase em amostras de sangue (3mL) de neonatos com suspeita de apresentar Deficiência de Biotinidase;
- 2.2.3.** Notificar os casos diagnosticados para serem acompanhados pela equipe médica e de nutrição da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRUPO DE ESTUDO

As amostras de sangue dos neonatos nascidos no período de junho a outubro de 2009, na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará foram coletadas em papel filtro padrão (Ferreira & Carvalho, 1982). É importante salientar que só foram incluídos na pesquisa recém-nascidos a termo, uma vez que a pré-maturidade pode interferir na dosagem da enzima biotinidase, de acordo com trabalho realizado pelo grupo do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (Cunha, 2008).

3.2 COLETA, CONSERVAÇÃO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

O material biológico (sangue periférico) utilizado no presente estudo foi colhido por venipunção dos recém-nascidos, uma vez que os mesmos foram submetidos a coletas para testes laboratoriais na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, sendo que as amostras eram colhidas em seringas, e então divididas entre os tubos de coleta do hospital e o papel-filtro (Whatman® #903®) utilizado para a dosagem de biotinidase. Dessa forma, os neonatos não necessitavam de duas punções, diminuindo a recusa por parte das mães.

Para as análises enzimáticas do presente estudo, dispensava-se uma gota de sangue em cada círculo do papel filtro. As amostras de sangue foram mantidas em temperatura ambiente até sua secagem completa (pelo menos 3 horas) (Figura 05), e então eram cobertas com papel laminado. Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Pará (LEIM-UFPa) para posterior análise qualitativa.

Intercientífica Ltda. (12) 3949-9333

LEIM
Laboratório de Estudos de Intolerância Alimentar

CARTÃO DE COLETA DE SANGUE

Data da Coleta: / /
Amostra número: _____

Paciente R.N.: _____ Data Nasc.: / /
Nome da Mãe: _____
End. Tel.: _____
Cidade: _____ Estado: _____

BIOTINIDASE
 Normal Deficiência Parcial Deficiência Total

ESSE LUGAR

Figura 05: Cartão de coleta com amostra sanguínea

Em caso de possível positividade no teste qualitativo para a deficiência de biotinidase, o procedimento seguinte seria a coleta de 3 mL de sangue periférico dos recém-nascidos para proceder a análise quantitativa da amostra. O material biológico colhido (sangue periférico) para esta análise é obtido por uma técnica pouco invasiva, utilizando punção venosa periférica. Apenas uma amostra se mostrou aparentemente positiva após duas análises qualitativas (a segunda análise qualitativa na mesma amostra foi feita para confirmação do primeiro resultado).

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (Anexo 1), de acordo com as resoluções 196/960 e 0251/97 do Conselho Nacional de Saúde, Brasil.

É conveniente ressaltar que todas as amostras em papel filtro utilizadas neste estudo foram coletadas de acordo com a concordância dos pais ou responsáveis pelos pacientes, os quais assinaram os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) concedendo autorização para a participação dos recém-nascidos no estudo.

3.4. ANÁLISES LABORATORIAIS

3.4.1 Análise colorimétrica qualitativa da enzima biotinidase

As análises da atividade da enzima biotinidase foram realizadas pelo método descrito por Knappe e colaboradores (1963). Através desse método é possível determinar a liberação de *p*-aminobenzoato (PABA) a partir do substrato artificial N-biotinil-*p*-aminobenzóico (B-PABA), um análogo da biocitina (Wolf *et al.*, 1983). Para ser identificado, o PABA liberado sofre diazotização.

A atividade da biotinidase foi avaliada através do ensaio colorimétrico qualitativo, no qual a intensidade da cor da reação ocorrida no papel filtro expressou o resultado. Quando houve atividade da biotinidase, a reação apresentou coloração púrpura, caso não houvesse, ou a atividade fosse parcial, a mesma não apresentaria cor (reação incolor) ou apresentar-se-ia com um tom de rosa claro.

Para iniciar a técnica, foram coletadas amostras de sangue dos neonatos, e então impregnadas em papel filtro devidamente identificado. O material biológico foi levado ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM-UFGA) para análise posterior. Seguindo o protocolo do teste, o papel-filtro foi picotado em confetes de 3 mm, a fim de se fazer a micro-reação, a qual ocorreu em placa multi-poços (96 poços).

Posteriormente, os confetes foram colocados na placa para que ocorresse a análise da atividade da enzima. As amostras foram feitas em duplicata, com um ou 2 confetes de 3 mm, com a intenção de diminuir a margem de erro dos testes. A partir de então, 30 μ L do substrato artificial N-biotinil-*p*-aminobenzóico (B-PABA) foram pipetados em cada um dos poços com os confetes repletos de amostra, e foram incubados a 37° C por 22 horas. Após a incubação, adicionou-se 30 μ L de Ácido Tricloroacético (TCA) a 30% com a finalidade de parar a reação. Em seguida foram adicionados 30 μ L de nitrito de sódio, sulfamato de amônio e N-1-naftiletilenodiamina, com intervalos de 3 minutos entre cada um dos reagentes. Dez minutos após a adição do último deles, observou-se presença ou ausência de cor púrpura, indicando ou não a atividade da biotinidase, respectivamente.

3.4.2 Análise colorimétrica quantitativa (em papel-filtro) da enzima biotinidase

Como uma opção para confirmação de resultados aparentemente positivos para a deficiência de biotinidase, utilizou-se uma técnica a qual não necessitava de uma nova coleta, pois nela é feita a dosagem quantitativa a partir da mesma amostra em papel-filtro.

Para a execução deste método, utilizam-se tubos ou *eppendorfs* denominados “teste” e “branco”. No “teste” a amostra (confete de 3 mm impregnado com sangue) é incubada com 0,8 mL do substrato artificial N-biotinil-p-aminobenzóico (B-PABA), e 0,1 mL de água destilada, enquanto que no “branco” acrescenta-se apenas a amostra e a água. Após 5 horas de incubação em banho-maria a 37° C, adiciona-se 0,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 30% no “teste” e no “branco”. Somente neste momento, adiciona-se 0,8 mL do substrato ao *eppendorf* contendo o “branco”. A partir de então, os procedimentos subseqüentes serão iguais tanto para o “teste” quanto para o “branco”.

Os *eppendorfs* com as amostras são homogeneizados e então centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Retira-se 0,8 mL do sobrenadante, transferindo-os para outros *eppendorfs*, e, em seguida, adiciona-se 0,1 mL de nitrito de sódio, sulfamato de amônio e dihidroclorido de N-1-naftiletilenodiamina, com intervalos de 3 minutos entre a adição dos mesmos. Por fim, faz-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 546 nm.

A atividade da enzima se dá pelo cálculo $\Delta \text{Abs} \times 26,41$ (nmol/min/mL), no qual 26,41 refere-se à constante da equação (Knappe, 1963).

Baseado na metodologia de Knappe (1963), os valores de referência para indivíduos com Deficiência de Biotinidase (em nmol/min/mL) é de 0,03 - 0,08 (0,05 \pm 0,04), para heterozigotos é de 0,16 - 0,30 (0,23 \pm 0,30), para controles normais tem-se a faixa de 1,41 - 3,16 (2,13 \pm 0,47), e, finalmente, para recém-nascidos normais o valor varia entre 1,10 - 1,69 (1,35 \pm 0,24).

3.4.3 Análise colorimétrica quantitativa (em soro/plasma) da enzima biotinidase

Posto que o resultado do teste do pezinho não é definitivo, pois os exames são apenas testes de triagem, os resultados alterados devem ser confirmados pela análise colorimétrica quantitativa, pois trata-se de um teste mais acurado.

A metodologia utilizada para dosagem quantitativa da atividade da biotinidase é baseada no método de Knappe (1963), a qual necessita da coleta do sangue total, para obtenção do soro ou plasma. O procedimento descrito abaixo se refere ao protocolo da técnica utilizada no trabalho:

1. Incubar 0,8 mL do substrato N-biotinil-p-aminobenzóico (B-PABA) com 0,1 mL de soro/plasma em um *ependorf* de 1,5 mL por 30 minutos a 38°C. Utilizar como “branco” uma amostra de soro/plasma inativado a 56° durante 30 minutos;

2. Interromper a reação adicionando 0,2 mL de TCA (Ácido Tricloroacético) a 30%;

3. Agitar (vortex) e centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos na temperatura de 4° C;

4. Remover 0,8 mL do sobrenadante e pôr em um outro *ependorf*. Adicionar ao mesmo 0,1 mL de nitrito de sódio (preparado na hora). Deixar por 3 minutos à temperatura ambiente;

5. Adicionar 0,1 mL de sulfamato de amônia 0,5 %. Agitar (vortex) e deixar novamente por 3 minutos à temperatura ambiente;

6. Por fim, adicionar 0,1 mL de dihidroclorido de N-1-naftiletilenodiamina 0,1% (diluído em água). Agitar (vortex) e incubar por 3 minutos à temperatura ambiente;

7. Ler a densidade óptica (D.O.) em um comprimento de onda de 546 nm. Calcular a atividade da enzima da seguinte forma: (D.O. – “branco”) x 9,51 = atividade enzimática expressa em nmol/min/mL de soro/plasma.

A título de esclarecimento, 9,51 refere-se ao fator de correção para diluição, tempo de incubação e coeficiente molar de extinção para o p-aminobenzoato (Coeficiente de extinção = 18,89 D.O./ nmol a 546 nm).

Os valores de referência para biotinidase variam entre faixas descritas por diversos pesquisadores, como de 5-9 nmol/min/mL (Shapira *et al.*, 1989); 4-8 nmol/min/mL (Wolf & Heard., 1989); e 4,4-12 nmol/min/mL (Pettit *et al.*, 1989). No presente estudo foram adotados como normais os valores entre 4,0 e 10,0 nmol/min/mL (Kobayashi, 2003).

Segundo Pettit e colaboradores (1989), a dosagem da enzima em heterozigotos para deficiência de biotinidase se dá por volta de 3,5 nmol/min/mL (2,2-5,2 nmol/min/mL); para indivíduos com deficiência parcial da enzima, a média é de 1,6 nmol/min/mL (0,7-2,1 nmol/min/mL); e, por fim, os pacientes com deficiência total da enzima apresentam dosagem de 0,2 nmol/min/mL (<0,7 nmol/min/mL) da enzima.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos RN foram previamente organizados em tabela do Excel[®] 2003, com colunas referentes ao nome da mãe, dia do nascimento do RN, expressão de cor com um confete, expressão de cor com 2 confetes por poço e dias de vida. Posteriormente os dados foram analisados no programa BioEstat 5.0, através do teste do *qui-quadrado*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

No período de junho a outubro do ano de 2009, foram obtidas 217 amostras de sangue total coletado em papel-filtro (Whatman® #903®) dos recém-nascidos da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCM-PA). A quantidade de crianças do sexo feminino e masculino foi equivalente, uma vez que o gênero não influencia na atividade da biotinidase ou no surgimento da doença (Pinto *et al.*, 1998).

De acordo com a permissão do comitê de ética, as coletas foram efetuadas em apenas três enfermarias da FSCM-PA, a saber: Santa Marta, Sant'Anna, e Maria Goreth, nas quais as crianças eram encaminhadas após o nascimento e permaneciam junto de suas mães. Embora o tempo de coleta tenha sido relativamente curto, o número de amostras foi satisfatório para o estudo, uma vez que o número de crianças submetidas às coletas era bastante variável, podendo ser de 1 a 6 coletas por dia, em média, e muitos dos recém-nascidos eram prematuros, o que diminuía ainda mais a demanda.

Para proceder às coletas, cada mãe ou responsável assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando a coleta de sangue do recém-nascido a ser estudado. Também foram entregues folderes explicativos (Anexo 3), além da presença do pesquisador esclarecendo quaisquer dúvidas, assim auxiliando no entendimento do propósito do trabalho, e diminuindo a recusa em relação à participação no mesmo.

Acredita-se que o fato das análises enzimáticas para Deficiência de Biotinidase oferecidas pelo presente estudo promoverem benefícios diretos aos pacientes e às famílias, através do diagnóstico de uma patologia grave e indisponível no sistema público de saúde, tenha auxiliado na maior aceitação por parte dos responsáveis.

Os neonatos triados neste trabalho nasceram a termo, e possuíam, em média, 2,2 dias de vida, variando de 0 a 14 dias de nascimento.

Os nomes dos recém-nascidos e o dia do nascimento foram previamente organizados em tabela do Excel para posterior avaliação da influência da idade do RN com a intensidade da cor da reação. De acordo com as análises estatísticas feitas pelo programa BioEstat 5.0, observou-se que não houve associação da faixa etária dos recém-nascidos e a intensidade de coloração da reação para a biotinidase.

4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas diariamente e submetidas à secagem total do sangue no papel-filtro à temperatura ambiente, seguidas de acondicionamento em papel alumínio para manutenção das propriedades biológicas das amostras. Posteriormente, foram realizadas as análises qualitativas da enzima biotinidase em placas multi-poços de poliestireno (Figura 06).

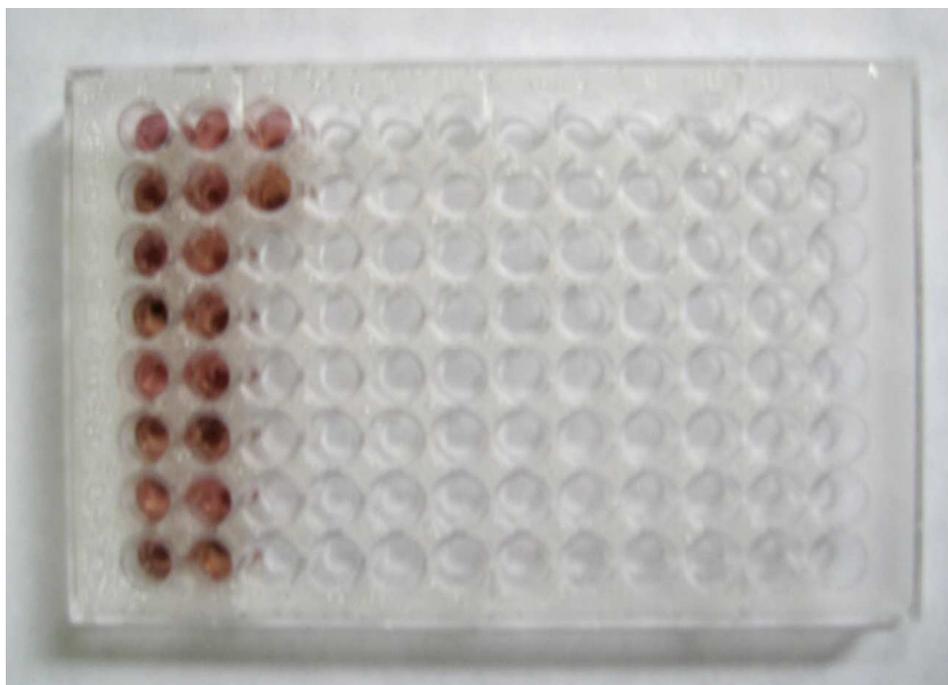


Figura 06: Placa multipoços contendo confetes de papel-filtro. Os poços com coloração púrpura indicam atividade da enzima biotinidase.

No estudo de González e colaboradores (2006) foi possível demonstrar, através de ensaios de performance, que em reações cuja atividade da biotinidase é inferior a 1,6%, não se pode observar visualmente a expressão da coloração, portanto, o limite de detecção se dá por volta de 2% da atividade da enzima (0,15 nmol/min/ml). Entretanto, como a Deficiência total de Biotinidase é detectada em pacientes com atividade inferior a 10%, essa limitação do método não influencia de forma significativa no diagnóstico para este distúrbio metabólico.

Dessa forma, a metodologia utilizada para avaliação da atividade de biotinidase, semelhante à utilizada neste trabalho, possui uma boa sensibilidade e especificidade para detecção da atividade desta enzima (González *et al.*, 2006).

4.3 CLASSIFICAÇÃO QUANTO À INTENSIDADE DA COLORAÇÃO

A fim de diminuir a margem de erro das análises, as amostras foram avaliadas quanto à atividade da enzima em duplicata; um poço com um confete de 3 mm de diâmetro, e outro com dois confetes, de mesma medida, repletos de sangue. Dessa forma, após o final da reação, onde deve haver a presença de cor na atividade da enzima, obtiveram-se parâmetros comparativos para a análise colorimétrica mais precisa, diminuindo ou anulando a necessidade de repetição caso houvesse alguma falha analítica em um dos poços da reação.

As reações foram classificadas visualmente, quanto ao grau de coloração, com uma metodologia de cruces; uma cruz (+) para as reações de cor púrpura fraca, duas cruces (++) para as reações de cor púrpura intermediária, três cruces (+++) para as reações com presença de cor púrpura intensa, ou seja, alta atividade da enzima, e ausência de cruces (-) para amostras que não apresentassem coloração.

Essa classificação permitiu avaliar visualmente a intensidade da cor expressa de acordo com a atividade enzimática, determinando de modo mais preciso o grau de coloração de cada uma das reações entre os diversos pacientes.

A classificação em cruces, feita pela análise visual, foi realizada por apenas um pesquisador, tornando a avaliação subjetiva, uma vez que não foram

feitas análises quantitativas para classificá-las. Por este motivo, para dar continuidade ao trabalho, sugere-se que as amostras sofram a comparação por, pelo menos, duas pessoas, a fim de aumentar a confiabilidade da avaliação.

Dentre as reações feitas com apenas um confete por poço, 56 apresentaram uma cruz, 133 foram avaliadas como apresentando duas cruzes, e 27 apresentaram a cor púrpura forte como resultado (+++). É importante frisar que a somatória das mesmas resulta em 216, uma vez que uma amostra apresentou-se incolor (-) ao final da reação da dosagem qualitativa da enzima, tanto com um quanto com dois confetes por poço.

Nas reações analisadas com 2 confetes, 70 amostras obtiveram uma cruz (+), 127 apresentaram cor relativa a duas cruzes (++) e apenas 19 condiziam com a cor relativa a três cruzes (+++) de intensidade de coloração.

De modo geral, tanto com um quanto com dois confetes, as reações com duas cruzes (++) predominaram, uma vez que, com apenas um confete, ela se demonstrou em 61,3% das reações, e, com 2 confetes, em 58,5% da amostragem (Figura 07).

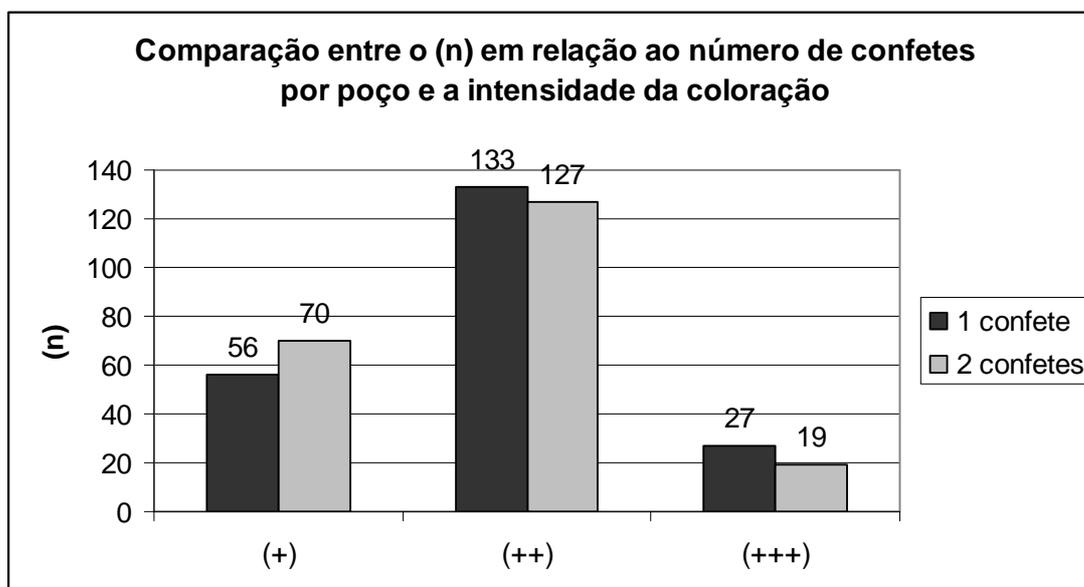


Figura 07: Demonstração gráfica dos dados referentes à quantidade de confetes por poço e a quantidade de amostras, classificadas de acordo com a intensidade da cor púrpura da reação.

A fim de avaliar se o procedimento de análise qualitativa com um ou dois confetes por poço poderia influenciar na interpretação dos resultados colorimétricos, recorreu-se ao teste *do qui-quadrado* para demonstrar estatisticamente essa relação. O valor relativo ao *qui-quadrado* foi de 3.085 ($p > 0.05$). Portanto, a partir dos cálculos, comprovou-se não haver diferença significativa entre a reação com um ou dois confetes de amostra por poço.

As reações que apresentaram cor pouco intensa, enquadradas no grupo de ausência de cruces (-), foram submetidas à nova dosagem qualitativa confirmatória (na mesma amostra) e, caso houvesse reprodutibilidade dos resultados, procedia-se a dosagem quantitativa em papel-filtro. Dessa forma, as suspeitas de deficiência de biotinidase eram confirmadas ou anuladas após comparação dos resultados com os valores de referência para recém-nascidos.

Na presença de reação com tom de púrpura claro, a amostra duplicada servia, inclusive, como confirmação ou exclusão da necessidade de nova análise qualitativa, ou análise quantitativa em papel-filtro, sem necessitar recorrer a uma nova coleta de sangue para obtenção do soro (dosagem quantitativa sérica).

Como dito anteriormente, dentre as 217 amostras analisadas, apenas uma apresentou-se incolor ao final da reação qualitativa em placa multi-poços. Para confirmação do resultado, foi realizada uma nova dosagem qualitativa na mesma amostra, demonstrando reprodutibilidade, ou seja, a reação permaneceu incolor.

A fim de realizar outro teste confirmatório do possível caso de deficiência de biotinidase, antes de necessitar uma nova coleta de sangue total para obtenção do soro, utilizou-se uma adaptação da técnica de Knappe (1963) utilizando papel-filtro com sangue total, ao invés de soro ou plasma. Neste teste, a reação apresentou valor inferior ao limite dos valores de referência entre (1,10 - 1,69 nmol/min/mL), além de permanecer incolor. Para segunda confirmação, utilizando a técnica quantitativa, seria necessária uma nova coleta de sangue da criança.

A mãe do paciente foi procurada para que fosse feita a nova coleta de sangue do recém-nascido, e então a dosagem quantitativa de biotinidase no soro da criança. Contudo, a localização da mesma foi difícil, uma vez que no prontuário do

RN não havia o telefone de contato, somente um endereço incompleto de outro município.

A partir desse resultado, o médico responsável pelo setor de neonatologia da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará foi notificado do possível caso de Deficiência de Biotinidase. Assim, recorreu-se ao serviço de assistência social da instituição para que localizassem a mãe do RN. O paciente não foi localizado até o presente momento, impedindo a confirmação do diagnóstico, e, conseqüentemente, caso fosse necessário, o encaminhamento da criança ao tratamento e controle da doença.

4.4 INTERFERENTES NA ATIVIDADE DA BIOTINIDASE

Diversas condições podem influenciar nos valores de biotinidase, a exemplo, as disfunções hepáticas. Os valores das transaminases oxalacética (TGO) e pirúvica (TGP) podem alterar de maneira inversamente proporcional a atividade da biotinidase. Portanto, é cabível sugerir que a baixa atividade predominante da enzima biotinidase se deva ao fato da função hepática dos recém-nascidos estudados estar prejudicada, ou seja, elevados níveis de transaminases levam a baixa atividade da biotinidase (Grier *et al.*, 1989; Cunha, 2008).

Devido ao fato de haver uma correlação negativa entre a atividade da biotinidase e os elevados níveis de bilirrubina nos RN, nascidos a termo e prematuros, é importante que se analise essas duas proteínas de maneira combinada, evitando, dessa forma, o surgimento de casos falso-positivos da doença (Schulpis *et al.*, 2003; Cunha, 2008).

Portanto, se elevadas concentrações de bilirrubina inibem a atividade da biotinidase, podem surgir conseqüências biológicas semelhantes a um fenômeno temporário de Deficiência de Biotinidase. Assim, sugere-se que os recém-nascidos que apresentam taxas elevadas de bilirrubina sejam encaminhados à intervenção clínica para reverter a deficiência parcial da enzima (Schulpis *et al.*, 2003)

Tendo em vista que a atividade hepática alterada pode influenciar na diminuição da atividade da biotinidase, mascarando uma provável Deficiência de

Biotinidase, seria interessante a dosagem de bilirrubina nos pacientes triados, como um parâmetro associativo.

Entretanto, neste estudo não foi possível a obtenção desses dados, uma vez que as amostras de sangue para o presente trabalho foram obtidas em papel-filtro, impedindo a dosagem de bilirrubina no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM-UFPA). Os valores de bilirrubinas totais e frações dosados no Laboratório da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará não foram disponibilizados para o estudo, impedindo que houvesse essa análise comparativa entre os valores de bilirrubina e biotinidase.

Em relação a resultados alterados, acredita-se, também, que o único grupo de medicamentos capaz de induzir um resultado falso-negativo nos testes de triagem neonatal sejam as sulfonamidas (Heard *et al.*, 1984; Pinto *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1990). Contudo, esses compostos não são usados no período neonatal, portanto conclui-se que não houve a presença de resultados falso-negativos no presente estudo, assim como na literatura.

Não houve significância de resultados falso-positivos no estudo, uma vez que apenas duas amostras necessitaram de uma nova dosagem enzimática para confirmação, por conta da ausência ou baixa intensidade de cor púrpura, representando apenas 0,92% da amostragem total, ou seja, menos de 1%.

As reações que se apresentaram incolores na primeira análise qualitativa foram submetidas a uma nova análise enzimática utilizando a mesma técnica. Na segunda análise qualitativa houve a presença de cor púrpura em uma delas, antes não demonstrada. Alguns dos fatores que podem ter influenciado no resultado falso-positivo na primeira análise da amostra são mau processamento ou armazenamento da amostra, pipetagem inadequada, material contaminado, entre outros.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Deficiência de Biotinidase é um erro inato do metabolismo, o qual segue todos os critérios para participação nos programas de triagem neonatal: os pacientes afetados não mostram sinais clínicos enquanto neonatos, impossibilitando o

diagnóstico clínico preciso; é uma doença com alta morbidade e que possui um tratamento com eficácia comprovada; além de possuir um teste de triagem simples, eficiente e de baixo custo (Souza *et al.*, 2002).

A inclusão do teste para esta deficiência já é previsto em pelo menos alguns dos programas de triagem neonatal pelo mundo (Thomason *et al.*, 1998; Broda *et al.*, 2001) e no Brasil, o Estado do Paraná já contempla o rastreamento para a Deficiência de Biotinidase em seu programa (Pinto *et al.*, 1998).

Sabe-se que o diagnóstico da Deficiência de Biotinidase durante a triagem neonatal é de extrema importância, uma vez que o tratamento precoce impede que, na maioria dos casos, surjam as seqüelas provenientes do quadro sintomático, causado pela perda da função da enzima, e conseqüente falha na utilização da biotina. Desta maneira, com a suplementação oral da vitamina diariamente, há a melhora da qualidade de vida não só dos recém-nascidos, como da família em questão.

Tendo em vista a implantação de um programa de Triagem Neonatal para Deficiência de Biotinidase no Estado do Pará, à semelhança do que ocorre no Estado do Paraná, como descrito por Pinto e colaboradores (1998), é necessário que se mantenham as coletas, e sejam alcançadas novas maneiras de expandir esse estudo, aumentando, dessa forma, o número de crianças triadas para este distúrbio metabólico congênito, chamando, assim, a atenção de autoridades governamentais.

No presente estudo não houve positividade confirmada para Deficiência de Biotinidase nas amostras analisadas, uma vez que grande parte das reações apresentou como resultado um padrão de coloração púrpura, demonstrando atividade enzimática normal.

Sugere-se um provável caso de Deficiência de Biotinidase, o qual ainda deve ser confirmado pela análise quantitativa da enzima na amostra. Para confirmação ou descarte da possibilidade de apresentar deficiência de biotinidase, a mãe do paciente foi procurada para que fosse feita a dosagem quantitativa de biotinidase no soro ou plasma, porém a mesma não foi localizada até o presente momento.

É importante frisar que o diagnóstico laboratorial para a Deficiência de Biotinidase não é um teste padrão realizado na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, e está também ausente no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), permitindo, assim, que os neonatos portadores deste distúrbio metabólico desenvolvam os sintomas posteriormente, devido à falta de diagnóstico laboratorial precoce.

Este estudo, se continuado e mantido com uma proporção maior de neonatos triados, pode gerar dados estatísticos relativos à incidência de pacientes com Deficiência de Biotinidase no Estado do Pará, suficientes para justificar a sua implantação no teste de triagem neonatal e chamar atenção para a implantação em outros Estados do Brasil.

Em busca da melhoria da qualidade de vida da população, este estudo teve um papel importante triando recém-nascidos para a Deficiência de Biotinidase, uma vez que o diagnóstico precoce da doença, antes do aparecimento dos sintomas, é a melhor forma de tratá-los, evitando as seqüelas oriundas da progressão da doença.

5. CONCLUSÕES

- Dentre as 217 amostras analisadas com 1 confete por poço, 56 apresentaram uma cruz, 133 apresentaram duas cruces, e 27 apresentaram a cor púrpura forte como resultado (+++).
- Nas amostras analisadas com 2 confetes por poço, 70 amostras obtiveram uma cruz (+), 127 apresentaram cor relativa a duas cruces (++) e apenas 19 condiziam com a cor relativa a três cruces (+++) de intensidade.
- Não houve diferença estatística significativa entre as análises com um ou dois confetes por poço.
- No presente trabalho não houve nenhum paciente com diagnóstico confirmado de Deficiência de Biotinidase até o presente momento.
- Realizou-se a triagem de um paciente com suspeita de Deficiência de Biotinidase, porém com diagnóstico ainda não confirmado, devido à necessidade de uma nova dosagem da enzima, de maneira quantitativa, a qual requer uma nova coleta de sangue total para obtenção do soro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, P. & WILFRED, G. Decrease in plasma biotinidase activity with normal albumin concentrations in experimental liver fibrosis. **Clinica Chimica Acta**, **334**: 245–247. 2003.
- BARTLETT, K.; GHNEIM, H.K.; STIRK, J.H.; WASTELL, H.J.; SHERRAT, H.S.A. & LEONAR, J.V. Enzyme studies in combined carboxylase deficiency. **Annals of the NY Academy Sciences**, **447**: 235-51. 1985.
- BRODA, E.; BAUMGARTNER, E.R.; SCHOLL, S.; STOPSACK, M.; HORN, A. & RHODE, H. Biotinidase determination in serum and dried blood spots-high sensitivity fluorimetric ultramicro-assay. **Clinica Chimica Acta**, **314**: 175–185. 2001.
- CHAN, P.W. & BARTLETT, K. A new solid-phase assay for biotin and biocytin and its application to the study of patients with biotinidase deficiency. **Clinica Chimica Acta**, **159**: 185-196. 1986.
- CHAPMAN-SMITH, A. & CRONAN JR, J.E. Molecular Biology of biotin attachment to proteins. **The Journal of Nutrition**, **129**: 477-484. 1999.
- CLAGUE, A. & THOMAS, A. Neonatal biochemical screening for disease. **Clinica Chimica Acta**, **315**: 99–110. 2002.
- CUNHA, L.M. **Investigação da atividade da enzima biotinidase em diferentes situações clínicas: Icterícia neonatal e fenilcetonúria**. Dissertação de Mestrado. Belém. Universidade Federal do Pará. 2008.
- FERREIRA, C.S. & CARVALHO, M.E. Padronizacao de uso de papel-filtro como suporte de material para reacoes sorologicas. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, **34**. 82-86. 1982.
- FRANÇA, S.N. & DOMINGOS, M.T. Triagem neonatal do hipotireoidismo congênito: novas conquistas... novos desafios... **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, **52** (4): 579-580. 2008.
- GONZÁLEZ, E.C.; MARRERO, N.; FRÓMETA, A.; HERRERA, D.; CASTELLS, E. & PÉREZ, P.L. Qualitative colorimetric ultramicroassay for the detection of biotinidase deficiency in newborns. **Clinica Chimica Acta**, **369**: 35 – 39. 2006.
- GONZÁLEZ-REYES, E.C. & MARRERO-GONZÁLEZ, N. Deficiencia de Biotinidasa. **Bioquimia**, **27** (3): 80-86. 2002.
- GRIER, R.E.; HEARD, G.S.; WATKINS, P. & WOLF, B. Low Biotinidase activities in the sera of patients with impaired liver function: evidence that the liver is the source of serum biotinidase. **Clinica Chimica Acta**, **186**: 397-400. 1989.
- GUTHRIE, R. The origin of newborn screening. **Screening**, **1**: 5-15.1992.
- HASSAN, Y.I. & ZEMPLINI, J. Epigenetic Regulation of Chromatin Structure and Gene Function by Biotin. **The Journal of Nutrition**, **136**: 1763–1765, 2006.
- HEARD, G.S.; MCVOY, J.S. & WOLF, B.A. Screening method for biotinidase deficiency in newborns. **Clinical Chemistry**, **30**: 125-127. 1984.
- HYMES, J. & WOLF, B. Human Biotinidase Isn't Just for Recycling Biotin. **The Journal of Nutrition**, **129**: 485–489. 1999.

- KAYE, C. Newborn Screening Fact Sheets. **Pediatrics**, **118** (3): 934-963. 2006.
- KIMURA, M.; FUKUI, T.; TAGAMI, Y.; FUJIWAKI, T.; YOKOYAMA, M.; ISHIOKA, C.; KUMASAKA, K.; TERADA, N. & YAMAGUCHI, S. Normalization of low biotinidase activity in a child with biotin deficiency after biotin supplementation. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, **26**: 715-719. 2003.
- KNAPPE, J.; BRUMMER, W. & BIEDERBICK, K. Reinigung und ligens chaftender biotinidase aus Schweinenierem und Lactobacillus casei. **Biochem Zeitschrift**, **338**: 599-613. 1963.
- KOBAYASHI, V.L.V.A. Aplicação de métodos colorimétricos para a determinação da atividade da enzima biotinidase no plasma de humanos. **Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Pará**, 2003.
- KOGL, F. & TONIS, B. Uber das Bios-Problem. Darstellung und Krystallisiertem biotin aus Eigelb. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, **242**: 43-73. 1936.
- MARDACH, R.; ZEMPLIENI, J.; WOLF, B.; CANNON, M.J.; JENNINGS, M.L.; CRESS, S.; BOYLAN, J.; ROTH, S.; CEDERBAUM, S. & MOCK, D.M. Biotin dependency due to a defect in biotin transport. **The Journal of Clinical Investigation**, **109**: 1617-1623. 2002.
- MATTOZO, M. & SOUZA, L.C. Triagem Neonatal em Santa Catarina: relato histórico, aspectos fisiopatológicos e métodos de análise realizados pelo Laboratório Central da Secretaria de Saúde do Estado. **NewsLab**, **68**: 84-102. 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde. O que é Triagem Neonatal? Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/visualizar_texto.cfm?idtxt=22939. Acesso em dez. 2008.
- MÖSLINGER, D.; MÜHL, A.; SUORMALA, T.; BAUMGARTNER, R. & STÖCKLER-IPSIROGLU, S. Molecular characterisation and neuropsychological outcome of 21 patients with profound biotinidase deficiency detected by newborn screening and family studies. **European Journal of Pediatrics**, **162**: 46-49. 2003.
- NAVARRO, P.C.; GUERRA, A.; ALVAREZ, J.G. & ORTIZ, F.J. Cutaneous and neurologic manifestations of biotinidase deficiency. **International Journal of Dermatology**, **39**: 363-382. 2000.
- NETO, E.C.; SCHULTE, J.; RUBIM, R.; LEWIS, E.; De MARI, J.; CASTILHOS, C.; BRITES, A.; GIUGLIANI, R.; JENSEN, K.P. & WOLF, B. Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **37**: 295-299. 2004.
- PABUÇCUOĞLU, A.; AYDOĞDU, S. & BAS, M. Serum Biotinidase Activity in Children With Chronic Liver Disease and Its Clinical Significance. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, **34** (1): 59-62. 2002.
- PACHECO-ALVAREZ, D.; SOLÓRZANO-VARGAS, R.S. & DEL RÍO, A.L. Biotin in Metabolism and Its Relationship to Human Disease. **Archives of Medical Research**, **33**: 439-447. 2002.
- PÉREZ-MONJARAS, A.; CERVANTES-ROLDÁN, R.; MENESES-MORALES, I.; GRAVEL, R.A.; REYES-CARMONA, S.; SOLÓRZANO-VARGAS, S.; GONZÁLEZ-NORIEGA, A. & LEÓN-DEL-RÍO, A. Impaired Biotinidase Activity Disrupts Holocarboxylase Synthetase Expression in Late Onset Multiple

Carboxylase Deficiency. **Journal Of Biological Chemistry**, **283** (49): 34150–34158. 2008.

- PETTIT, D.A.; AMADOR, P.S. & WOLF, B. The quantitation of biotinidase activity in dried blood spots using microtiter transfer plates: identification of biotinidase-deficient and heterozygous individuals. **Analytical biochemistry**, **179** (2): 371-4. 1989.
- PINTO, A.L.R.; RAYMOND, K.M.; BRUCK, I.E. & ANTONIUK, S.A. Estudo de prevalência em recém-nascidos por deficiência de biotinidase. **Revista de Saúde Pública**, **32** (2): 148-52. 1998.
- RAMALHO, A.S.; MAGNA, L.A. & PAIVA E SILVA, R.B.A. Portaria MS n.º 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, **24** (4): 244-250. 2002.
- SCHULPIS, K.H.; GAVRILI, S.; TJAOURANIS, J.; KARIKAS, G.A.; KAPIK, A. & COSTALOS, C. The effect of neonatal jaundice on biotinidase activity. **Early Human Development**, **72**: 15-24. 2003.
- SCHWARTZ, I.V.D.; NETO, E.C. & GIUGLIANI R. Considerações sobre o momento da colheita da triagem neonatal. **Jornal de Pediatria**, **76** (6): 474-475. 2000.
- SHAPIRA, E.; BLITZER, M.G.; MILLER, J.B. & AFRICK, D.K. **Biochemical Genetics: A Laboratory Manual**, Oxford, Oxford University Press, 1989. p. 44-45.
- SOUZA, C.F.M.; SCHWARTZ, I.V. & GIUGLIANI, R. Neonatal screening of metabolic disorders.** *Ciência & Saúde Coletiva*, **7** (1): **129-132. 2002.**
- STANLEY, J.S.; GRIFFIN, J.B. & ZEMPLINI, J. Biotinylation of histones in human cells: effects of cell proliferation. **Eur J Biochem**, **268**: 5424 –9. 2001.
- STRAUSSBERG, R.; SAIAG, E.; HAREL, L.; ATTIAS, J.; KORMAN, S. & AMIR, J. Reversible deafness caused by biotinidase deficiency. **Pediatric Neurology**, **23**: 269-270. 2000.
- SUBCOMMITTEE ON THE NINTH EDITION OF THE RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES (RDA), FOOD AND NUTRITION BOARD, COMMISSION ON LIFE SCIENCES. **Recommended dietary allowances.** Nat Res Council-Nat Acad Sci, Washington, DC. 1980; 9th Edition.
- THOMASON, M.J.; LORD, J.; BAIN, M.D.; CHALMERS, R.A.; LITTLEJOHNS, P.; ADDISON, G.M.; WILCOX, A.H. & SEYMOUR, C.A. A systematic review of evidence for the appropriateness of neonatal screening programmes for inborn errors of metabolism. **Journal of Public Health Medicine**, **20**: 331–43. 1998.
- WOLF, B. Biotinidase: its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism. **Journal of Nutritional Biochemistry**, **16**: 441–445. 2005.
- WOLF, B. & FELDMAN, G. L. The Biotin-Dependent Carboxylase Deficiencies. **The American Journal of Human Genetics**, **34**: 699-716. 1982.
- WOLF, B. & HEARD, G.S. Disorders of Biotin Metabolism. In: **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. Scriver, C.R.; Beaudet, A.L., Sly, W.S.; Valle, D (eds).. New York, McGraw-Hill, 1989. p. 2083-103.
- WOLF, B. & HEARD, G.S. Screening for biotinidase deficiency in newborns worldwide experience. **Pediatrics**, **85**: 512–7. 1990.

- WOLF, B & MCVOY, J.S. A sensitive radioassay for biotinidase activity: deficient activity in tissues of serum biotinidase-deficient individuals. **Clinica Chimica Acta**, **135**: 275-281. 1983.
- WOLF, B.; GRIER, R.E.; ALLEN, R.J.; GOODMAN, S.I. & KIEN, C.L. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. **Clinica Chimica Acta**, **131**: 273-281. 1983.
- WOLF, B.; JENSEN, K.; HÜNER, G.; DEMIRKOL, M.; BAYKAL, T.; DIVRY, P.; ROLLAND, M.-O.; PEREZ-CERDÁ, C.; UGARTE, M.; STRAUSSBERG, R.; BASEL-VANAGAITE, L., BAUMGARTNER, E.R., SUORMALA, T., SCHOLL, S., DAS, A.M.; SCHWEITZER, S.; PRONICKA, E. & SYKUT-CEGIELSKAJ, J. Seventeen novel mutations that cause profound biotinidase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, **77**: 108–111. 2002.
- WOOD, H.G. & BARDEN, R.E. Biotin enzymes. **Ann Rev Biochem**, **46**: 385-413. 1977.
- ZEMPLINI, J.; WIJERATNE, S.S.K. & HASSAN, Y.I. Biotin. **Biofactors**, **35** (1): 36-46. 2009.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou no dia 05 de maio de 2009 o projeto de pesquisa intitulado “**TRIAGEM NEONATAL PARA DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE EM RECÉM-NASCIDOS NA FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ**” de autoria da pesquisadora LÍVIA DOVALE TEIXEIRA DA COSTA sendo orientado pela Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva, obtendo **APROVAÇÃO** com autorização para desenvolvê-lo, nesta Instituição.

Belém, 06 de maio de 2009.

Informo ainda, que V. S. deverá apresentar relatório semestral (previsto para 30/06/09), anual e/ ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto (item VII. 13.d. da Resolução nº 196/96 – CNS / MS).

Atenciosamente,

Simone R. S. S. Conde
Coordenadora do CEP
FSCMPA *Conde*

Dra. Simone Conde
Coordenadora do CEP

7.2 ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: **Triagem Neonatal para Deficiência de Biotinidase na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará**

Pesquisador Responsável: Luiz Carlos Santana da Silva / Livia do Vale Teixeira da Costa

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade Federal do Pará

Telefones para contato: (91) 3201-8030 / (91) 3229-4349 / (91) 8184-0630

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

Responsável legal: _____

R.G. Responsável legal: _____

O Sr.^(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Triagem Neonatal para Deficiência de Biotinidase na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará”, de responsabilidade do pesquisador Livia do Vale Teixeira da Costa

_____, neste ato representado por mim, _____ está sendo convidado a participar de um estudo denominado **Triagem Neonatal para Deficiência de Biotinidase na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará** cujos objetivos e justificativas são a implantação de um Programa de Triagem Neonatal para Deficiência de Biotinidase no Estado do Pará, a partir da análise desta enzima em neonatos nascidos na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, visto que o diagnóstico precoce é de extrema importância em caso de doenças congênitas assintomáticas em recém-nascidos. Por ser de diagnóstico clínico complicado, os portadores da Deficiência de Biotinidase, geralmente, não são identificados como tais, levando a uma progressão perigosa da doença, a qual pode ser letal se não tratada. Por este motivo, a análise bioquímica dessa doença será de grande valia no diagnóstico e cura dessas crianças.

A sua participação no referido estudo será no sentido de permitir que a criança a ser analisada seja submetida à realização de um exame, no qual será analisada a presença ou não da Deficiência de Biotinidase, que é uma doença grave, caracterizada por falhas na utilização e reciclagem da biotina (uma vitamina). Os sintomas dessa doença não são visíveis nos recém-nascidos, e surgirão posteriormente caso a doença não seja diagnosticada, podendo causar atraso no desenvolvimento, cegueira, perda de cabelo, surdez, convulsões, levando até a morte se não for tratada.

Fui alertado de que é possível esperar alguns benefícios dessa pesquisa para o meu representado, bem como o diagnóstico precoce da doença, caso ela esteja presente no recém-nascido. Quanto mais cedo a doença for detectada, mais rápido será o início do tratamento, o que evitará o aparecimento dos primeiros sintomas e dará à criança uma vida normal.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo. Por se tratar de uma pesquisa realizada através da coleta de sangue, há um risco mínimo, porém são complicações as quais não interferem na atividade física ou mental do recém-nascido. Levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, caso haja o diagnóstico da Deficiência da enzima Biotinidase, as crianças terão que ser submetidas a um tratamento que se seguirá pela vida toda, que se dá através da suplementação da vitamina biotina, facilmente comprada em farmácias de manipulação.

Estou ciente de que a sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro

dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o (a) identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que pode haver recusa à participação no estudo, bem como pode ser retirado o consentimento a qualquer momento, sem precisar haver justificativa, e de que, ao sair da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo à assistência que vem recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Livia do Vale Teixeira da Costa (UFPA) e Luiz Carlos Santana da Silva (UFPA), e com eles poderei manter contato pelos telefones (91) 3201-8030 / (91) 3229-4349 / (91) 8184-0630.

É assegurada a assistência do meu representado durante toda a pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação de -

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, autorizo a participação de

_____ na referida pesquisa, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação.

Eu, _____, RG nº _____, responsável legal por _____, RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Belém, _____ de _____ de _____

Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal
responsável por obter o consentimento

Nome e assinatura do

Testemunha

Testemunha

7.3 ANEXO 3 - FOLDER EXPLICATIVO (DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE)

COMO SABER O RESULTADO?

Os resultados dos exames estarão disponíveis no prazo de uma semana, e poderão ser entregues no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFPA. Para mais informações, ligar para o telefone (91) 3201-8030, falar com Livia ou Prof. Luis Santana.



Triagem Neonatal para Deficiência de Biotinidase em Recém-Nascidos na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo
- LEIM
Prof. Dr. Luiz Carlos Santana
E-mail: lcss@ufpa.br
livia.dovale@hotmail.com
Tel: (91) 3201-8030



Livia do Vale Teixeira da Costa

O QUE É DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE?

A Deficiência de Biotinidase é uma doença caracterizada por falhas na utilização e reciclagem da biotina (uma vitamina). Os sintomas da deficiência de biotinidase são quase imperceptíveis nos recém-nascidos, e podem surgir quando as crianças se encontram entre uma semana a 2 anos de idade.

Os principais sintomas são:

- Perda de cabelo;
- Convulsão;
- Atraso no desenvolvimento;
- Erupções cutâneas;
- Conjuntivite;
- Problemas visuais;
- Problemas auditivos;
- Problemas respiratórios.

Caso não haja tratamento adequado, a criança com deficiência de biotinidase deve apresentar agravamento no quadro de sintomas, podendo levar à morte.

O tratamento para a deficiência de biotinidase é bastante simples, barato e eficaz, sendo feito a partir da ingestão de uma vitamina chamada biotina, vendida facilmente em farmácias de manipulação. É importante lembrar que quanto mais cedo o início do tratamento, melhores serão os resultados.

COMO É FEITO O EXAME?

O exame será realizado sem custo para o paciente, ou seja, é GRÁTIS.

Será coletada uma amostra de sangue do recém-nascido, de forma pouco invasiva e sem dor. Utilizaremos 3 gotinhas de sangue do bebê em papel-filtro (teste do pezinho), e, então, analisaremos no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo. Caso a amostra se mostre positiva, os pesquisadores entrarão em contato com os responsáveis pelo bebê, e então haverá uma reconvocação para uma nova coleta. É extremamente importante comparecer à reconvocação, pois só assim será confirmada a doença, e o bebê será encaminhado ao tratamento adequado, tendo uma vida normal e sem o aparecimento dos sintomas.