

Diagnóstico genético e análise da associação genótipo-fenótipo para 126 indivíduos brasileiros com atividade reduzida da enzima biotinidase

Randon DN^{1,2}, Sperb-Ludwig F^{1,2}, Ribeiro EM³, de Andrade MD⁴, de Oliveira BM⁵, Pinto LLC⁶, de Souza CFM¹, Félix TM^{1,7}, Sanseverino MT¹, Silva TO⁸, Schwartz IVD^{1,2,7}

1. Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul ; 3. Hospital Infantil Albert Sabin; 4. Universidade Federal do Ceará; 5. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 6. Hospital Infantil Joana de Gusmão; 7. Instituto Nacional de Doenças Raras – InRaras; 8. Hospital Maria Lucinda

INTRODUÇÃO

A deficiência de biotinidase (DB) é causada por variantes patogênicas bialélicas no gene *BTD*, levando à deficiência de biotina e das carboxilases mitocondriais biotina-dependentes. O diagnóstico baseia-se na dosagem da atividade da biotinidase em plasma ou soro. Indivíduos com atividade reduzida podem ser classificados como portadores de DB profunda (<10% da atividade), DB parcial (10–30%), ou serem heterozigotos para variantes patogênicas (sem necessidade de tratamento). A DB foi incluída no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) em 2012. Desde então, nosso grupo tem investigado o gene *BTD*, publicando dados referentes a 72 indivíduos brasileiros com atividade enzimática reduzida [Borsatto et al., 2014¹ e 2017²].

OBJETIVO

Atualizar o panorama genético da DB no Brasil, incluindo os resultados publicados por Borsatto et al. (2014¹; 2017²).

METODOLOGIA

População

Um total de 126 indivíduos (72 casos previamente publicados) com suspeita de DB — com base em pelo menos uma dosagem de atividade da biotinidase abaixo do ponto de corte — foram incluídos. Destes, 102 (80,9%) foram identificados por triagem neonatal.

Fenótipo observado – conforme a atividade enzimática

Foi estabelecido utilizando o maior valor da atividade da biotinidase. Valores quantitativos de atividade enzimática estavam disponíveis para 110/126 (87,3%) indivíduos. Estes foram classificados nas seguintes categorias:

- Atualmente normal n=7 (6,4%)
- Heterozigotos n=60 (54,5%)
- DB parcial n=25 (22,7%)
- Limítrofe heterozigoto/DB parcial n=8 (7,3%)
- DB profunda n=7 (6,4%)
- Limítrofe heterozigoto/normal n=3 (2,7%).

Fenótipo esperado – conforme o genótipo

Foi estabelecido apenas para variantes recorrentes com impacto conhecido e configuração cis/trans determinada (**Tabela 1**). O DNA foi extraído de amostras de sangue ou de células de mucosa bucal, seguido por PCR e sequenciamento dos éxons 2, 3 e 4 do gene *BTD*. As diretrizes do *American College of Medical Genetics and Genomics* foram utilizadas para classificar as variantes inéditas.

Tabela 1. Classificação da deficiência de biotinidase segundo o genótipo						
Alelo	Deficiência de biotinidase		Indivíduos não afetados			
	Profunda	Parcial	~Heterozigoto	Heterozigoto	~Normal	Normal
1	Patogênico grave	Patogênico grave	Patogênico moderado	Patogênico grave	Patogênico moderado	Selvagem - não patogênico
2	Patogênico severo	Patogênico moderado	Patogênico moderado	Patogênico moderado	Selvagem - não patogênico	Selvagem - não patogênico

Alelo patogênico grave: <50% de atividade da biotinidase; alelo patogênico moderado: ~60%, e tipo selvagem ou não patogênico: >60%.

RESULTADOS

Gene *BTD*

A amostra apresentou 63 genótipos, incluindo 27 variantes patogênicas. As mais prevalentes foram:

- c.1330G>C p.(Asp444His) → 60,0%
- c.755A>G p.(Asp252Gly) → 6,9%
- c.[1330G>C;511G>A] p.[(Ala171Thr;Asp444His)] → 5,7%
- c.1368A>C p.(Gln456His) → 5,1%

Três variantes inéditas foram identificadas, além das seis previamente descritas (**Tabela 2**):

- c.269T>A p.(Leu90His): provavelmente patogênica
- c.1004C>T p.(Ala335Val): significado incerto
- c.1321G>A p.(Gly441Arg): significado incerto

REFERÊNCIAS

- Borsatto et al. (2014) Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 Brazilian patients. BMC Med Genet 15:96.
- Borsatto et al. (2017) Biotinidase deficiency: Genotype biochemical phenotype association in Brazilian patients. PLoSOne 12:e0177503.

AGRADECIMENTOS: CNPq, CAPES, FIPE-HCPA

Tabela 2. Variantes inéditas do gene *BTD* identificadas em indivíduos brasileiros com atividade reduzida da biotinidase.

Variante		Éxon	Genótipo (c.DNA)		Classificação		Fenótipo observado
c.DNA	Proteína		Alelo 1	Alelo 2	In silico	In vitro	
c.119T>C	p.(Leu40Pro)	2	c.119T>C	c.1330G>C	Provavelmente patogênica	Patogênica grave	DB Parcial
c.479G>A	p.(Cys160Tyr)	4	c.1330G>C	c.479G>A	Provavelmente patogênica	Patogênica grave	Heterozigoto/Parcial
c.664G>A	p.(Asp222Asn)	4	c.664G>A	Normal	Provavelmente patogênica	Provavelmente benigna	Heterozigoto
c.1337T>C	p.(Leu446Pro)	4	c.1337T>C	1413T>C	Benigna	Patogênica grave	Normal
c.1466A>G	p.(Asn489Ser)	4	c.[511G>A;13330G>C]	c.1466A>G	Provavelmente patogênica	Patogênica moderada	Parcial
c.962G>A	p.(Trp321*)	4	c.962G>A(;);1413T>C		Patogênica	-	Heterozigoto
c.269T>A	p.(Leu90His)	2	c.269T>A	Normal	Provavelmente patogênica	-	Heterozigoto
c.1004C>T	p.(Ala335Val)	4	c.1004C>T(;);1062G>A (;);1330G>C		Indeterminado	-	Parcial
c.1321G>A	p.(Gly441Arg)	4	c.1321G>A	Normal	Indeterminado	-	Heterozigoto

As três variantes inéditas identificadas neste estudo estão destacadas em negrito. O fenótipo observado representa a classificação de acordo com os níveis de atividade da biotinidase.

Fenótipo esperado

A classificação da BD, segundo o genótipo, esteve disponível para 107/126 indivíduos (84,9%):

- Normal n=27 (25,3%)
- Heterozigoto n=44 (41,1%)
- BD parcial n=29 (27,1%)
- BD profunda n=7 (6,5%)

Fenótipo observado vs. esperado

A comparação foi possível em 91/126 (72,2%) casos, e a concordância foi determinada em 65 (71,4%) deles (**Figura 1**).

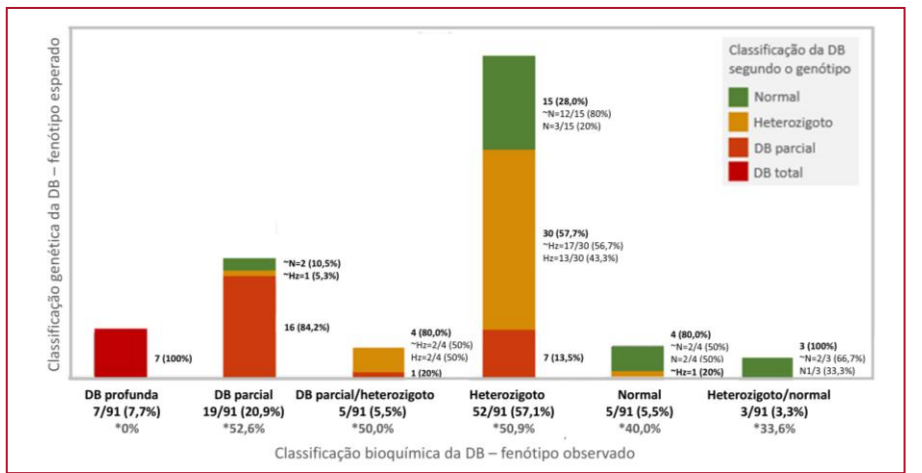


Figura 1. Fenótipo observado vs. fenótipo esperado (n=91). BD: Deficiência de biotinidase. Hz: heterozigoto. N: normal. *Frequência do alelo p.(Asp444His). A classificação da BD segundo os valores quantitativos de atividade enzimática é apresentada no eixo horizontal. Indivíduos com valores dentro de ±0,1 do ponto de corte foram considerados limítrofes (parcial/heterozigoto e heterozigoto/normal). Para cada nível bioquímico de classificação, a classificação baseada no genótipo é mostrada no eixo vertical.

CONCLUSÃO

O PNTN é eficaz na detecção tanto da DB profunda quanto parcial. Entretanto, observa-se a identificação predominante de indivíduos heterozigotos, o que ressalta a necessidade de reavaliar o ponto de corte do teste enzimático. A DB profunda é rara no Brasil; contudo, este estudo baseia-se em amostragem por conveniência. O perfil do gene *BTD* mostra-se mais heterogêneo que em outras regiões do mundo. No país, p.(Asp444His) também representa mais do 50% dos alelos patogênicos, sendo identificada em todas as categorias de classificação bioquímica, com exceção da DB profunda. Embora a correlação genótipo–fenótipo nem sempre seja consistente, a análise genética contribui para esclarecer resultados bioquímicos limítrofes ou discordantes, apoiar o aconselhamento genético, identificar e classificar novas variantes.