



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES
CLÍNICAS PROFISSIONAL**

CARLA LEONOR MELO VINAGRE MACHADO

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA SOBRE A
ATIVIDADE DA ENZIMA BIOTINIDASE EM RECEM-NASCIDOS A
TERMO E PRÉ-TERMO**

Belém-Pará

2017

CARLA LEONOR MELO VINAGRE MACHADO

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA SOBRE A
ATIVIDADE DA ENZIMA BIOTINIDASE EM RECEM-NASCIDOS A
TERMO E PRÉ-TERMO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de mestre em Análises Clínicas Profissional.
Área de Concentração: Análises Clínicas.

Orientador: Prof^o. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

Belém-Pará

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Machado, Carla Leonor Melo Vinagre.

Influência dos níveis de bilirrubina sobre a atividade da enzima biotinidase em recém-nascidos a termo e pré-termo / Carla Leonor Melo Vinagre Machado ; Orientador, Luiz Carlos Santana da Silva. – Belém, 2017.

59 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Biotinidase. 2. Icterícia. Neonatal. 3. Recém-nascido. I. Título.

CDD: 22. ed.: 618.9201

1. Neoplasia Gastrointestinal. 2. Estado Nutricional. 3. Qualidade de vida. 4. Fatores Socioeconômicos. I. Título.

CDD: 22. ed.: 616.994

CARLA LEONOR MELO VINAGRE MACHADO

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE BILIRRUBINA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA
BIOTINIDASE EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de mestre em Análises Clínicas Profissional.

DATA DA AVALIAÇÃO: 08 / 05 / 2017

BANCA EXAMINADORA:

- Prof^a. Dr^a. Aurimery Gomes Chermont / UFPA

- Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Neves de Souza/ UFPA

- Prof^a. Dr. Luis Francisco Heredeiro Baute/ UFPA

Conceito: _____

Aos meus queridos esposo e filha, Edilson e Laura Beatriz, às minhas filhas Clara Leonor e Sofia Laura (*in memorian*), ao meu pai (*in memorian*), pelo imenso amor,

dedicação, paciência, carinho e por sempre acreditarem nos meus sonhos. Vocês (juntamente com minha mãe e irmãos) são presentes de Deus em minha vida. Muito obrigada pelo apoio, confiança e fé que sempre em mim depositaram. Amo-os incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luiz Carlos Santana da Silva pela orientação na realização deste trabalho.

Aos queridos alunos e graduandos da UFPA, Marcello José Ferreira Silva e Victor Cezar Gomes Melo, por seus preciosos apoio e auxílio na coleta e análise de dados deste trabalho, respectivamente.

À Silvia Helena Maia do Rosário, técnica em Laboratório da FSCMPA, pela sua preciosa ajuda na coleta de material biológico dos pacientes.

Aos genitores dos pacientes, que permitiram da participação dos seus filhos neste trabalho.

Ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFPA (LEIM/UFPA), o qual, através de seu coordenador, prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva e colaboradores, que muito incentivou e ensinou sobre a biotinidase e a técnica de quantificação da atividade enzimática, tendo sido fundamentais para a realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da UFPA (LAC/UFPA), o qual, através do biólogo Dr. André Pinto e seus colaboradores, muito contribuíram para a realização das análises laboratoriais desta pesquisa.

À Mariseth Carvalho de Andrade, pelas suas preciosas análises, ensinamentos e orientações estatísticas.

À primeira turma do mestrado da MACPro, pelos momentos inesquecíveis, a amizade conquistada e alegria compartilhada.

Aos meus queridos irmãos Rodrigo e Carlos, que sempre me auxiliaram e dedicaram muita amizade, amor e carinho. Obrigada, pela confiança, pelas alegrias, pelo apoio e por estarem sempre ao meu lado.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

RESUMO

MACHADO, Carla Leonor Melo Vinagre. *Influência dos níveis de bilirrubina sobre a atividade da enzima biotinidase em recém-nascidos a termo e pré-termo*. Belém, PA: UFPA, 2017.

A biotinidase é uma amido-hidrolase, responsável pela reciclagem da biotina endógena e liberação da biotina ligada a proteínas da dieta. A deficiência de biotinidase resulta na deficiência secundária de biotina que leva à deficiência múltipla

das carboxilases. Fatores genéticos a causam e alguns estudos revelaram a influência de outros fatores em sua atividade. Estudos *in vitro* também confirmaram esses resultados. O presente estudo teve como principal objetivo investigar se os níveis sanguíneos de bilirrubina interferem na atividade da enzima biotinidase em recém-nascidos (RN) a termo e pré-termo tardios ictericos. Os objetivos específicos foram: verificar a atividade da enzima biotinidase em RN ictericos; avaliar associação entre enzimas marcadoras da função hepática e esta enzima e estabelecer protocolos para o seguimento de pacientes. Sua dosagem foi determinada pelo método colorimétrico de Knappe (1963). Os níveis no soro de bilirrubina, aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT) em RN com icterícia foram avaliados por métodos colorimétricos. Participaram do estudo 103 recém-nascidos: 92 RN a termo (23 ictericos e 69 anictéricos) e 11 RN pré-termo tardios (3 ictericos e 8 anictéricos), com 48 a 96 horas de vida. Os resultados mostraram uma discordância entre a avaliação clínica e os critérios laboratoriais. Não houve correlação da enzima biotinidase com as variáveis diagnóstico clínico e sexo. Quanto à dosagem da Bilirrubina total (BT), houve diferença significativa da média dos valores entre os grupos nos anictéricos. Nos RN com níveis elevados da enzima AST e níveis próximo do valor mínimo normal, para a ALT, a atividade da biotinidase manteve-se em níveis normais. Os valores aumentados de AST e praticamente normais de ALT não influenciaram na atividade da enzima independente do sexo. Como a maioria da população brasileira que apresenta a deficiência da biotinidase, esta é da forma parcial e estudos retrospectivos norte-americanos de longa duração comprovaram a eficácia do tratamento com biotina na prevenção dos sintomas e manutenção do desenvolvimento físico e cognitivo normais, o início do tratamento ao nascimento e a permanência deste até a possível elucidação diagnóstica dos casos, mediante o acompanhamento prolongado destes pacientes, surge como melhor opção até o presente momento. Novos estudos com casuísticas maiores podem resultar em mais amplos esclarecimentos quanto a esta rara doença, de manifestações diversas e seu modo específico e multifacetado de tratamento.

Palavras Chave: Biotinidase, Icterícia Neonatal, Recém-nascido.

ABSTRACT

MACHADO, Carla Leonor Melo Vinagre. Influence of bilirubin levels *Newborn kidneys with a term and pre-term can interfere in the activity of the biotinidase enzyme*. Belém, PA: UFPA, 2017, UFPA.

Biotinidase is a starch-hydrolase responsible for the recycling of endogenous biotin and the release of the biotin bound to dietary proteins. Biotinidase deficiency results

in secondary deficiency of biotin, leading to multiple carboxylase deficiency. Genetic factors cause it and some studies have revealed the influence of other factors on their activity. In vitro studies also confirmed these results. The aim of this study was to investigate whether bilirubin blood levels interfere at the activity of the biotinidase enzyme in term and late-preterm neonates (NN) with icterus skin. The specific aims were: to verify the activity of the biotinidase enzyme in icteric NN; to evaluate the association between liver function markers enzymes and the biotinidase enzyme; and to establish protocols for patients follow-up. Its dosage was determined by the colorimetric method of Knappe (1963). Serum levels of bilirubin, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in icteric infants were evaluated by colorimetric method. The study included 103 newborns: 92 full-term NN (23 icteric and 69 anicteric) and 11 preterm NN (3 icteric and 8 anicteric) with 48 to 96 hours of life. The results showed a disagreement between the clinical evaluation and the laboratory criteria. There was no correlation between the biotinidase enzyme and the variables clinical diagnose and sex. Regarding the dosage of total bilirubin (TB), there was a significant difference in mean values in the anicteric groups. In NBs with high levels of AST enzyme and levels close to the normal minimum value, for ALT, biotinidase activity remained at normal levels. Increased values of AST and practically normal ALT did not influence sex-independent enzyme activity. As in the majority Brazilian population with biotinidase deficiency, this is partial and long-term retrospective North-American studies have demonstrated the efficacy of biotin treatment in preventing symptoms and maintaining normal physical and cognitive development, the initiation of treatment at birth and its permanence until the possible diagnostic elucidation of the cases, through the prolonged follow-up of these patients, appears as the best option until the present moment. New studies with larger cases may result in further clarification regarding this rare disease, its manifestations and its specific multifaceted mode of treatment.

Keywords: Biotinidase, Neonatal Icterus, Newborn.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Recém-nascidos classificados segundo a idade gestacional e o peso de nascimento	p.34
Tabela 2	Recém-nascidos ictericos avaliados laboratorialmente	p.35
Tabela 3	Recém-nascidos anictéricos avaliados laboratorialmente	p.35

Tabela 4	Recém-nascidos ictericos avaliados clinicamente quanto a ictericia	p.36
Tabela 5	Recém-nascidos avaliados clinica e laboratorialmente quanto à presença de ictericia	p.36
Tabela 6	Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto ao sexo avaliados quanto à atividade da enzima Biotinidase	p.36
Tabela 7	Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à atividade da enzima Biotinidase	p.37
Tabela 8	Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Bilirrubina total (BT) (expressa em mg/dL).	p.37
Tabela 9	Recém-nascidos ictericos, distribuídos quanto à dosagem da Bilirrubina Total (BT)	p.38
Tabela 10	Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Bilirrubina Direta (BD)	p.38
Tabela 11	Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Bilirrubina Indireta (BI)	p.38
Tabela 12	Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Alanino Aminotransferase (ALT)	p.39
Tabela 13	Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto ao sexo e avaliados quanto a atividade da AST	p.39
Tabela 14	Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto ao sexo e avaliados quanto a atividade da ALT	p.39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura Simplificada da Molécula da Biotina	p. 12
Figura 2 – Carboxilases Dependentes de Biotina	p. 14
Figura 3 – Ciclo de Utilização e Reciclagem Metabólica	p. 15
Figura 4 – Atividade da Biotina em Diferentes Valores de pH	p. 17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Aspectos Gerais	12
1.2. Funções da Biotina e sua Relação com as Carboxilases	13
1.3. Implicações da Deficiência da Biotina	14
1.4. Reciclagem Metabólica da Biotina	15
1.5. Biotinidase	16

2. OBJETIVOS	27
3. JUSTIFICATIVA.....	28
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
4.1. Caracterização da amostra analisada	30
4.2. Critérios de exclusão e inclusão	30
4.3. Coleta, Conservação e Transporte das Amostras	30
4.4. Aspectos Éticos	31
4.5. Ensaio Enzimático de Biotinidase em Soro	31
4.6. Dosagem de Bilirrubina Total e Frações	32
4.7. Dosagem de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alaminao Aminotransferase (ALT)	32
4.8. Análise Estatística	33
5. RESULTADOS	34
4.1. Dados de Identificação	34
4.2. Dados Clínico-Laboratoriais	34
6. DISCUSSÃO	41
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	45
8. CONCLUSAO	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICES	52
ANEXO.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

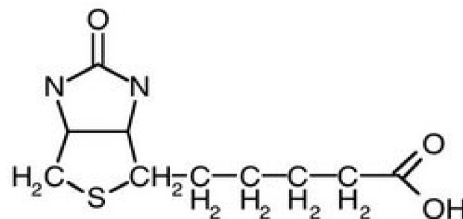
As vitaminas são moléculas orgânicas indispensáveis à saúde, sendo necessárias em pequenas quantidades para o metabolismo normal. Devem ser obtidas através da dieta, já que não podem ser sintetizadas total ou suficientemente pelo organismo (MARCONDES et al., 2003).

Apesar da deficiência de uma única vitamina ser relativamente rara na espécie humana, pode ocorrer devido a um erro hereditário do metabolismo ou a uma restrição alimentar (BURTIS; ASHWOOD, 2008).

A biotina, conhecida anteriormente como vitamina H ou B8, é hidrossolúvel, pertencente ao complexo B e sintetizada por plantas e por grande parte dos seres procariotos (CHAPMAN-SMITH; CRONAN Jr., 1999).

A figura 1 representa a estrutura molecular da biotina, composta por dois anéis heterocíclicos fundidos, ligados a uma cadeia lateral de ácido valérico, que possui um grupo carboxila em sua porção terminal (WOLF, 2012).

Figura 1. Estrutura simplificada da molécula da biotina



Fonte: Adaptado de CHAPMAN-SMITH; CRONAN Jr., 1999.

Existem duas formas de apresentação da biotina proveniente da dieta: a forma livre e aquela ligada a proteínas. A biotina livre é absorvida pelo intestino sem dificuldades, porém a biotina ligada às proteínas só pode ser liberada após a digestão enzimática (WOLF, 2012).

Os teores de biotina nos alimentos são bastante diversos. As melhores fontes são fígado, rins, gema de ovo e alguns vegetais, os quais contêm de 20 a 120 mg/ 100g de porção comestível. Alimentos como carnes magras, frutas, cereais e pães contêm somente de 1 a 10 mg/ 100g (McMAHON, 2002).

Uma outra fonte de biotina para os organismos superiores é a síntese microbiana da flora intestinal (MARCONDES et al., 2003).

1.2 Funções da Biotina e sua Relação com as Carboxilases

As vitaminas hidrossolúveis funcionam como coenzimas nos processos metabólicos de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos (NELSON et al., 2013). A biotina atua como coenzima de quatro carboxilases encontradas em seres humanos (figura 2). Ela transporta o grupo carboxila para o perfeito funcionamento dessas carboxilases (WOLF, 2012).

A Acetil Coenzima A Carboxilase catalisa a ligação do bicarbonato a acetilcoenzima A para produzir Malonil- Coenzima A, o que representa uma etapa limitante para a biossíntese de ácidos graxos no citoplasma (ZEMPLINI; MOCK, 1999). As outras carboxilases dependentes de biotina são mitocondriais:

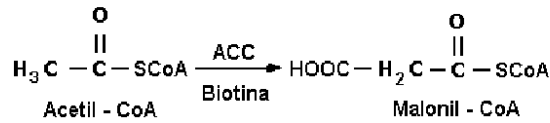
1. Piruvato Carboxilase: enzima que transforma o piruvato em oxalacetato, um intermediário para a biossíntese de fosfoenopiruvato e, por último, da glicose;

2. Propionil Coenzima A Carboxilase: participa do catabolismo dos aminoácidos isoleucina, valina, metionina e treonina e do catabolismo de ácidos graxos de cadeia longa ímpar;

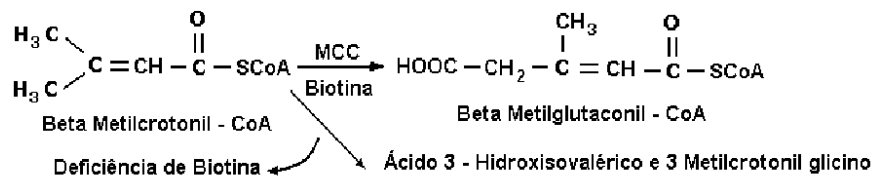
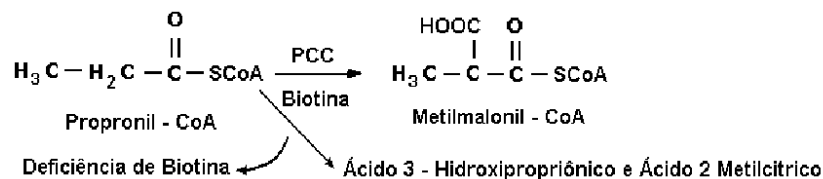
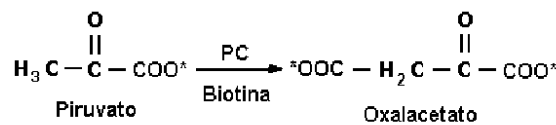
3. β -Metilcrotonil Coenzima A Carboxilase catalisa a conversão de β -metilcrotonil Coenzima A a Metilglutaconil Coenzima A, que é fundamental para o catabolismo do aminoácido leucina (ZEMPLINI; MOCK, 1999).

Figura 2. Carboxilases dependentes de biotina. ACC: acetil-CoA carboxilase; PC: piruvato carboxilase; PCC: propionil-CoA carboxilase; CC: β -etilcrotonil-CoA carboxilase.

Citosol e Mitocôndria



Mitocôndria



Fonte: adaptado de ZEMPLINI; MOCK, 1999).

1.3 Consequências da Deficiência da Biotina

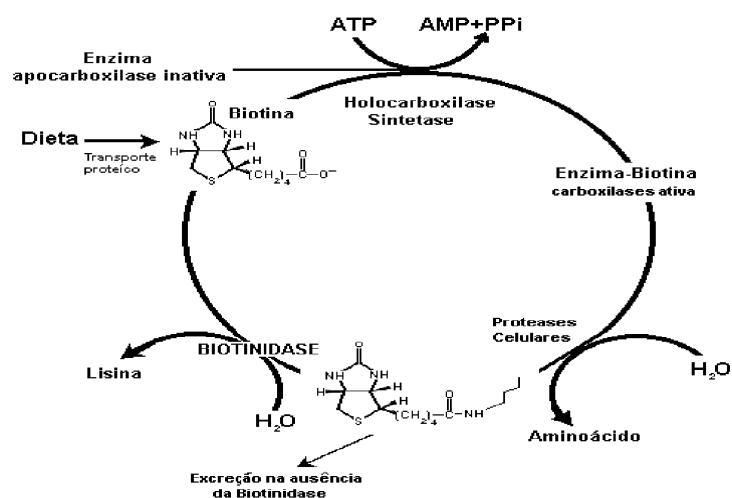
A deficiência de biotina reduz a atividade das carboxilases e provoca o desvio dos substratos para rotas metabólicas alternativas. Tais rotas podem produzir valores anormais de excreção urinária de certos ácidos orgânicos que podem ter suas dosagens utilizadas para o diagnóstico da produção inadequada ou ausente de biotina (NELSON et al., 2013).

1.4 Reciclagem Metabólica da Biotina

No organismo humano, as Apocarboxilases, carboxilases na forma inativa, tornam-se enzimaticamente ativas ao efetuarem ligação covalente com a biotina. Esta ligação ocorre entre o grupamento carboxílico da biotina e um grupo amino de um resíduo de lisina, existente no sítio ativo das enzimas. Na forma ativada, estas são conhecidas como holocarboxilases. Esta reação é catalisada pela enzima holocarboxilase sintetase (WOLF, 2005). A biotina precisa ser primeiramente ativada antes de se ligar às carboxilases. Esta reação ocorre também através da ação da enzima holocarboxilase sintetase, resultando na formação de um composto intermediário, o biotil adenilato. É este composto que se liga as Apoenzimas, transformando-as em carboxilases enzimaticamente ativas (NYHAN, 1987 *apud* PINTO, 1995).

Após realizarem as suas atividades, as carboxilases são degradadas proteoliticamente pelo sistema autofágico lisossômico, liberando a biocitina (ou biotinil-lisina). Em seguida, ocorre o rompimento da ligação biotina e resíduo de lisina, produzindo biotina livre. A enzima responsável por este rompimento é a biotinidase (WOLF, 2005; VANVLECK et al., 2015). A sequência desse processo pode ser observada na figura 3.

Figura 3. Ciclo de utilização e reciclagem metabólica da biotina. As duas principais enzimas envolvidas são a holocarboxilase sintetase e a biotinidase.



Fonte: adaptado de SCRIVER et al., 2001

1.5 Biotinidase

1.5.1. Histórico

Na década de 50, Thomas & Peterson detectaram uma enzima no fígado suíno, capaz de liberar a biotina dos peptídeos digestivos. Simultaneamente, Wright et al. (1950) descreveram uma enzima plasmática humana que hidrolisava a biocitina (produto da degradação proteolítica das carboxilases). Esta enzima foi denominada de biotina amida amidohidrolase e comumente é chamada de biotinidase (HARPER, 1999 *apud* MORENO-ARANGO; TEXIDOR LLOPIZ, 2005).

Foi apenas em 1983 que Wolf e colaboradores demonstraram que o defeito bioquímico primário em pacientes com deficiência de carboxilases múltiplas de forma juvenil ocorre devido a uma deficiência na atividade desta enzima (WOLF, 2015).

1.5.2 Características da Enzima Bi

1.5.2.1 Otinidase

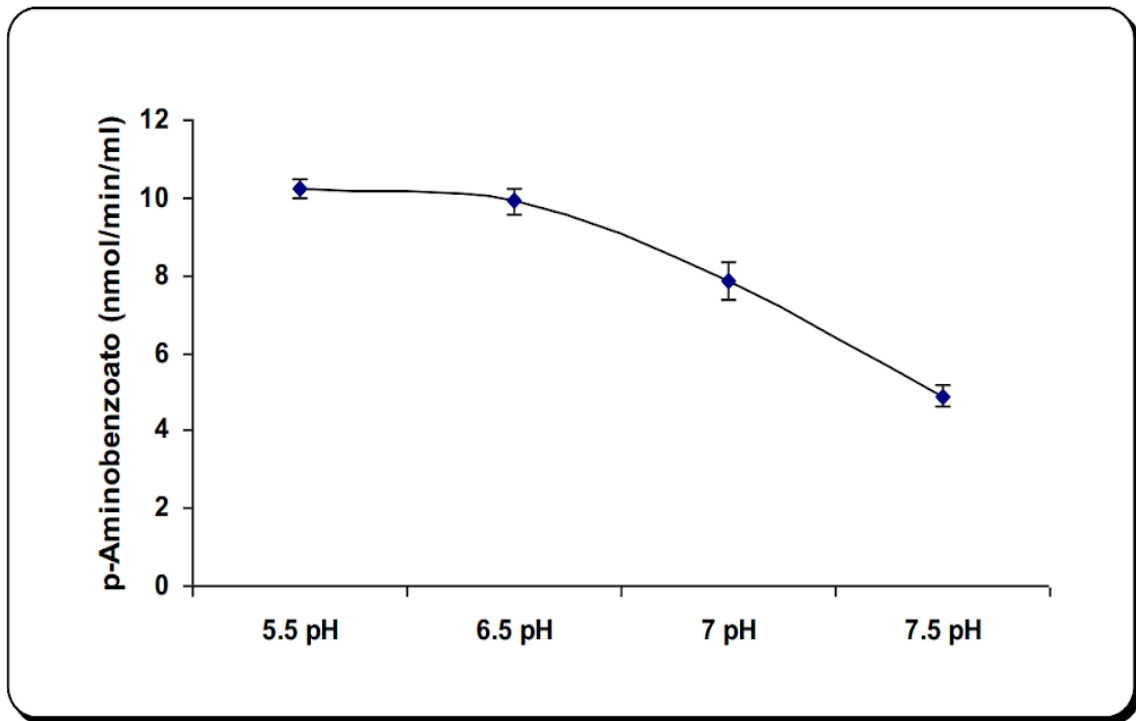
É uma glicoproteína monomérica, com massa molecular entre 76 a 77 Kilodaltons (Kda). É expressa principalmente no fígado, rins pâncreas, pulmões, coração e placenta.

O gene que a codifica está localizado no cromossomo 3, na região 3p25 e está organizado dentro de quatro éxons. Atualmente, mais de 150 mutações conhecidas respondem por deficiências da biotinidase. A função da enzima biotinidase está relacionada à clivagem da biocitina e a biotinilação de proteínas específicas, (como as histonas, por exemplo) ou pequenos aceptores moleculares, através da biotinidase sérica (WOLF, 2012; SENANAYAKE et al., 2015).

1.5.3. Cinética da Biotinidase

A biotinidase sérica humana possui ótima atividade na faixa de pH entre 5 a 7 para o substrato artificial ácido N-biotinil-p-minobenzóico N-b-p-ABA) (figura 4). O mecanismo regulatório da enzima é mediante inibição competitiva pela ação da biotina (WOLF, 2005).

Figura 4. Atividade da Biotinidase em diferentes valores de pH.



Fonte: SOUZA, 2004.

1.5.4. Deficiência da Biotinidase

É um erro inato do metabolismo que pertence ao grupo das Acidemias Orgânicas (NELSON et al., 2013). É um transtorno autossômico recessivo onde, tanto a absorção de biotina através de fontes dietéticas, quanto sua reutilização são prejudicadas, já que levam a deficiência de várias enzimas dependentes da biotina, como: a propionil-CoA carboxilase, a β -metil-crotonil-Co Acarboxilase, a piruvato carboxilase e a acetil-Co Acarboxilase (BORSATTO et al., 2014).

Sua incidência é de 1:110.000, nos casos de deficiência parcial da enzima; de 1:137.000 nos casos de deficiência total da enzima, produzindo uma incidência média de 1:60.000 a 1:61.000 (KIM et al., 2010; WOLF, 2012).

1.5.4.1 Classificação (Borsatto et al., 2014; Jay et al., 2015)

a) Deficiência Parcial da atividade da biotinidase: ocorre nos casos em que o valor da atividade da enzima se situa entre 10 e 30 % do valor normal.

b) Deficiência Total da atividade da biotinidase: ocorre nos casos em que o valor da atividade de biotinidase se encontra menor ou igual a 10%.

1.5.4.2 Consequências Clínicas da Deficiência da Biotinidase

O impedimento da reciclagem da biotina, resultando na sua não utilização por parte das carboxilases, produz manifestações clínicas muito variadas, destacando-se: dermatites, alopecia, convulsões, geralmente mioclônicas, espasmos, imunodeficiências, hipotonia, problemas respiratórios como a hiperventilação, estridor laríngeo e a apnéia, conjuntivite, candidíase, ataxia, e, em consequência, atraso no desenvolvimento (WOLF, 2012; NELSON et al., 2013; WOLF, 2015; VANVLECK et al., 2015; JAY et al., 2015).

Estudo clínico e genético de 38 pacientes brasileiros sugere que a deficiência parcial de biotinidase é a mais comum no país (BORSATTO et al., 2014; VANVLECK et al., 2015).

Tais pacientes geralmente apresentam sintomas leves na vigência de infecções prolongadas como gastroenterites moderadamente graves ou em situações de estresse (WOLF, 2012; VANVLECK et al., 2015; JAY et al., 2015).

Se o tratamento for tardio, podem ocorrer danos irreversíveis, como perdas auditivas, visuais, como a atrofia óptica, retardo mental, coma e até mesmo a morte (WOLF, 2012; BORSATTO et al., 2014; WOLF, 2015; VANVLECK et al., 2015; SENANAYAKE et al., 2015; JAY et al., 2015).

Entre os achados bioquímicos, destacam-se a acidemia láctica, hiperamoninemia, cetoacidose e acidúria orgânica (WOLF, 2012; VANVLECK et al., 2015; SENANAYAKE et al., 2015).

1.5.4.3 Diagnóstico

A atividade de biotinidase pode ser medida usando o método colorimétrico quantitativo e semiquantitativo descrito por Knappe et al. (1963), modificado. A análise colorimétrica quantitativa permite diferenciar os pacientes em normais, deficientes parciais e deficientes totais em relação à atividade da enzima.

Várias adaptações neste método contribuíram para a determinação quantitativa e qualitativa da biotinidase em amostras de sangue total colhidas em

papel filtro, tais quais àquelas usadas em muitos programas de triagem neonatal (HEARD et al., 1984; DOVE PETTI et al., 1999; KIM et al., 2010).

Outro método utilizado consiste na liberação de p-aminobenzoato (PABA) a partir do substrato artificial N-biotinil-p-aminobenzóico (N-b-p-ABA), através da realização da Cromatografia Líquida de Alta Precisão (HPLC), sendo a concentração de PABA determinada fluorimetricamente (HAYAKAWA; OIZUMI, 1986).

1.5.4.4 Tratamento

O tratamento para a deficiência total da biotinidase é baseado na administração de biotina via oral, em elevadas doses, que variam de 5 a 20 mg/dia; crianças com deficiência parcial, são tratadas com 1 a 5 mg/dia (WOLF, 2012; VANVLECK et al., 2015; SENANAYAKE et al., 2015; JAY et al., 2015).

O início precoce do tratamento pode prevenir as manifestações clínicas da doença que podem iniciar no período neonatal, até o 28º dia de vida do lactente, ocorrendo geralmente entre o segundo e quinto mês de vida, dependendo do grau da deficiência enzimática (NELSON et al., 2013; WOLF, 2015; VANVLECK et al., 2015).

Pacientes com deficiência total da enzima se tornam sintomáticos entre uma semana e 10 anos de vida, com idade média de 3,5 meses, porém precisam ser tratados, pois os sintomas são graves (WOLF, 2012; VANVLECK et al., 2015).

Para os pacientes com deficiência parcial da enzima não existe consenso quanto à necessidade de tratamento. Um estudo retrospectivo realizado em Michigan, EUA, acompanhou por 25 anos 22 pacientes com deficiência total e 120 pacientes com deficiência parcial de biotinidase, detectadas por triagem neonatal; todos iniciaram o uso de biotina via oral, de 10 a 15 mg/dia, logo após o nascimento, com boa adesão terapêutica e pareciam ter um desenvolvimento físico e cognitivo normais (JAY et al., 2015).

Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), refere variação de dosagem de 5 a 20 mg/dia, via oral, independentemente da idade e que decresce com o aumento da mesma. O único método capaz de monitorar a adequação da dose ao paciente, consiste na dosagem de ácidos orgânicos na urina, que deve normalizar-se. Porém, 20% das crianças com a deficiência mantém dosagens

normais, mesmo na vigência de sintomas (RIGHETTO et al.; 2010; LARA et al., 2014).

1.5.4.5 Relações entre a atividade da enzima biotinidase e a Icterícia Neonatal

• Icterícia Neonatal

Akinpelu et al. (2013) afirmaram que a icterícia ocorre em até 60% dos RN, sendo esta condição clínica mais comum no período neonatal. De acordo com Maisels et al. (1999), a icterícia neonatal ocorre quando as vias normais de metabolismo de excreção da bilirrubina estão alteradas. A perda de eritrócitos circulantes, responde por cerca de 75% da produção de bilirrubina diária do RN; as moléculas heme teciduais são transformadas em bilirrubina no sistema reticuloendotelial com monóxido de carbono (CO).

Buthani (2006), considera a icterícia neonatal como a manifestação clínica da hiperbilirrubinemia plasmática, definida pela concentração sérica de bilirrubina direta superior a 2,0 mg/dL, em qualquer momento.

A bilirrubina plasmática não conjugada é lipossolúvel, chamada de bilirrubina indireta (BI), sendo transportada no plasma ligada a albumina; por conseguinte, esta entra nos hepatócitos conjugando-se com o ácido uridino difosfato glicurônico (UDPG), através da ação da glicuroniltransferase, produzindo um novo pigmento: a bilirrubina hidrossolúvel conjugada, excretada nos canalículos biliares (espaços tubulares formados por hepatócitos adjacentes) e no intestino delgado. Esta bilirrubina conjugada pode ser reabsorvida pela circulação, adicionando-se à carga total de bilirrubina não conjugada (MAISELS et al., 1999).

Dentre os principais fatores predisponentes de icterícia neonatal estão: hiperbilirrubinemia devido ao aumento do volume eritrocitário, com diminuição de sua sobrevivência e da circulação entero-hepática, diminuição da captação, conjugação e excreção hepáticas da bilirrubina (MAISELS et al., 1999).

A população neonatal, segundo a idade gestacional, é caracterizada como RN pré-termo (ou prematuros), que nascem com menos de 37 semanas completas de gestação; RN a termo, que nascem com 37 até menos de 42

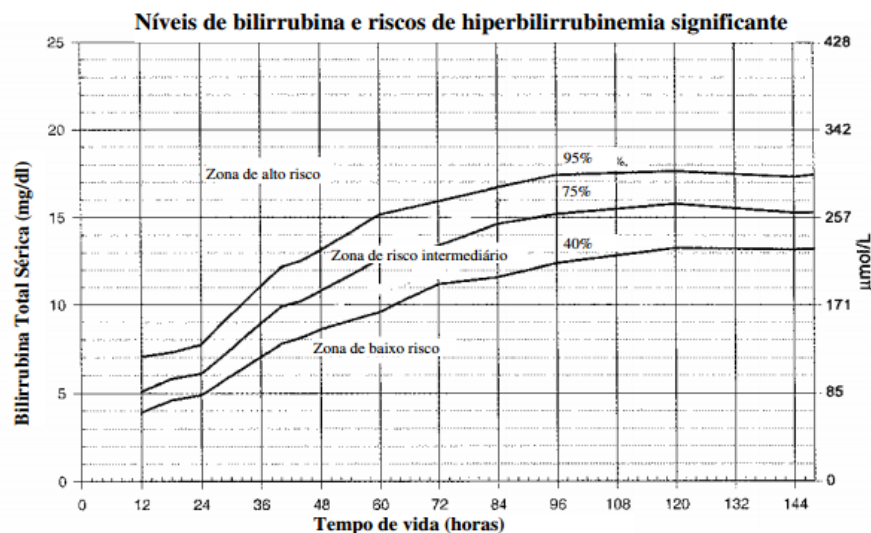
semanas de gestação completa; e RN pós-termo, que nascem com 42 semanas ou mais (RAMOS, 2003).

Para a detecção e tratamento precoces da hiperbilirrubinemia, realiza-se a triagem para icterícia neonatal, em recém-nascidos prematuros e a termo, mediante a dosagem dos níveis de bilirrubina total (BT) no soro, correlacionando-a com a idade gestacional do RN em horas. Estes são os dois fatores mais importantes para a avaliação de níveis de bilirrubina de risco para sequelas neurológicas, as quais são potencializadas pela presença de um estado patológico subjacente responsável pela icterícia (AKINPELU et al., 2013).

Os recém-nascidos pré-termo tardios – RN - PTT (34 – 36 semanas e 6 dias de gestação), geralmente pesam mais de 2500 g, sendo responsáveis por mais de 70% dos nascimentos prematuros, são imaturos fisiológica e metabolicamente, apresentando elevada morbimortalidade (RUGOLO, 2011).

Os níveis de bilirrubina que apresentam risco significativo para os neonatos são mostrados no gráfico da figura 5. Os níveis de risco dependem do tempo de vida do RN em horas e podem ser classificados como alto (acima de 95%), intermediário (entre 40% e 75%) e baixo (abaixo de 40%). Desta forma, a concentração de bilirrubina estará entre valores de 5 a 17 mg/dL, podendo chegar a valores acima de 20 mg/dL (BHUTANI; JOHNSON; SIVIERI, 1999).

Figura 5. Gráfico dos níveis de Bilirrubina que apresentam riscos de Hiperbilirrubinemia para RN.



Fonte: BHUTANI; JOHNSON; SIVIERI, 1999.

● **Definição e origem da Bilirrubina**

Bhutani (2006) conceitua bilirrubina como um pigmento derivado do processamento do grupo heme, sendo 80% derivada da destruição das hemácias e 20% de outras hemoproteínas, sendo a principal os citocromos.

As concentrações de bilirrubina são expressas geralmente nas unidades mg/dL ou $\mu\text{mol/L}$, onde 1 mg/dL equivale a 17,1 $\mu\text{mol/L}$ aproximadamente.

O feto produz duas vezes mais bilirrubina que o adulto; e as produz precocemente em torno da 24.^a semana. A biliverdina é encontrada na vida fetal em torno 16.^a semana de vida. No feto, a excreção da bilirrubina é completamente diferente da do adulto, não havendo interesse por parte do organismo fetal no desenvolvimento do sistema de glicuronização e conjugação.

A hiperbilirrubinemia ocorre devido a um desequilíbrio no balanço da bilirrubina, onde mais bilirrubina é produzida e menos é excretada.

● **Transporte da Bilirrubina no Feto**

No intestino do feto a via de excreção da bilirrubina é a placenta, e apenas 40mg de bilirrubina é encontrada no mecônio. Normalmente, a bilirrubina não conjugada (BI) resultante da destruição das hemácias fetais envelhecidas, é depurada através da placenta para a circulação materna onde é conjugada no fígado da gestante. Para ser transportada através da placenta a bilirrubina deve permanecer em sua forma não conjugada. Desta forma, muitos RN apresentam um acúmulo transitório de BI nos primeiros dias de vida (MARCONDES et al., 2003; RAMOS et al., 2003; WANG et al., 2006).

● **Captção e Conjugação da Bilirrubina**

Ligada às proteínas, a bilirrubina chega ao fígado e é captada pelo hepatócito. Provavelmente, o complexo bilirrubina-albumina dissocia-se na membrana hepatocitária, na qual a bilirrubina penetra, e no citoplasma dessas células liga-se às proteínas Y e Z (também chamadas ligandinas), que transportam a bilirrubina até o retículo endoplasmático (RE), onde ela será conjugada.

No RE, a bilirrubina combina-se enzimaticamente com o ácido uridino difosfato glicurônico (UDPG) através da ação da glicuroniltransferase, o que produz um novo pigmento: a bilirrubina conjugada, também chamada de bilirrubina direta (BD), que é hidrossolúvel e suficientemente polar para ser excretada pela bile ou filtrada pelos rins (RAMOS et al., 2003; WANG et al., 2006; MARCONDES et al., 2003).

Importante dizer que a enzima glicuroniltransferase representa o passo limitante da taxa de conjugação de bilirrubina; apresentando-se em concentrações mais baixas em RN prematuros, quando comparados aos de termo. O mesmo acontece com as concentrações de ligandina (NELSON et al.; 2013).

● Excreção da Bilirrubina

No íleo e intestino grosso, os glicuronatos são removidos por enzimas bacterianas (beta-glicuronidases), resultando os urobilinogênios, que são incolores. Estes são oxidados a compostos corados, as urobilinas ou estercobilinas, que dão cor às fezes. Parte da urobilina reabsorvida nos intestinos (ciclo enterohepático) é excretada na urina, dando-lhe cor amarela (MAISELS, 1999).

No RN, não há flora bacteriana intestinal até cerca de sete dias de vida, não se produzindo, portanto, estercobilina por esta via. Por outro lado, a ação ativa da beta-glicuronidase, hidrolisa a bilirrubina conjugada até bilirrubina indireta, a qual será reabsorvida, aumentando então a importância dessa via durante o período neonatal, pois na icterícia “fisiológica” do RN, não há eliminação urinária de bilirrubina, o que mantém a urina clara (MARCONDES et al., 2003).

● Metabolismo Fetal da Bilirrubina

No período de vida fetal precoce, a bilirrubina produzida é toda transportada mediante ligação à alfa-fetoproteína, pois a concentração de albumina é muito reduzida. O fígado fetal tem capacidade de conjugação bastante limitada; esta aumenta com a idade gestacional: após 40 semanas, a quantidade de uridinodifosfoglicotransferase (UDPG-T), uma enzima específica para bilirrubina, é

cerca de 10 vezes maior em relação a prematuros de 30 semanas, por exemplo (MARCONDES et al., 2003).

● Principais Causas de Hiperbilirrubinemia Indireta no RN

Bhutani (2002) destaca as principais causas de Hiperbilirrubinemia Indireta no RN, sendo estas:

- *Sobrecarga de Bilirrubina ao Hepatócito*: Doenças hemolíticas: 1- Hereditárias: Imunes (Incompatibilidade Rh, ABO), outras alterações enzimáticas (deficiência de G6PD, piruvatoquinase etc.), Alterações nas Membranas do eritrócito: esferocitose, Hemoglobinopatias: alfatalassemia; 2- Adquiridas: infecções bacterianas e virais. Coleções sanguíneas extravasculares: 1- HIC, pulmonar ou gastrointestinal; 2- Cefalohematoma; 3- Sangue deglutido.

- *Policitemia*: RN pequenos para a idade gestacional (PIG), RN de mãe diabética, transfusão feto-fetal e materno fetal, clampeamento tardio ou ordenha de cordão, circulação enterohepática aumentada de bilirrubina, malformações gastrointestinais: obstrução, estenose hipertrófica do piloro; Jejum oral ou baixa oferta láctea enteral; Icterícia pelo leite materno.

- *Deficiência ou Inibição de Conjugação Hepática de Bilirrubina*: Síndrome de Crigler Najjar tipo 1 e 2; Síndrome de Gilbert; Hipotireoidismo congênito.

● Principais causas de Hiperbilirrubinemia Direta no RN

A icterícia no RN ou no lactente jovem, com predomínio da BD (conjugada), pode ocorrer:

1. Devido a uma doença hepatocelular (Hepatite neonatal);
2. Por um defeito de excreção da BD (Síndrome de Dubin-Johnson, Síndrome de Rotor);
3. Obstrução intra e extra-hepática ao fluxo da bile (Tumor ou brida).

Na colestase há diminuição da função excretória do hepatócito, com falha na excreção de bile, redução do fluxo biliar, acúmulo de bile nas vias biliares intra e

extra-hepáticas, regurgitação da bile para o sangue, aumentando a BD no mesmo e tendo por consequência a redução da bile no intestino (hipocolia fecal), devido ao aumento da oferta de BD para os rins, produzindo a colúria (MURAHOVSKI, 2013).

1.5.4.6 Classificação da Icterícia

Bhutani e Lois (2007) referem que a bilirrubina sérica total (BST) hora-específica maior que o percentil 95 (para RN saudáveis) equivale a valores > 17mg/dL para idade superior a 72 horas. Pode ser evidenciado que a maioria desses lactentes em risco apresenta produção elevada de bilirrubina e/ou problemas na sua eliminação. A dificuldade em eliminar bilirrubina pode ser evidenciada nos RN pré-termo (RNPT) e também naqueles com ingestão reduzida de leite ou com infecção intercorrente.

Bhutani e Lois (2007) afirmam que é considerada hiperbilirrubinemia grave, levando em conta o risco de neurotoxicidade, conforme definido pelos níveis de BST (20mg/dL ou mais para lactentes a termo, saudáveis, de baixo risco) ou um aumento no nível de BST > 0,20 mg/dL/hora, dessa forma é indicativa a intervenção com o uso de fototerapia intensiva.

A icterícia é a manifestação clínica da hiperbilirrubinemia, sendo classificada em: icterícia não colestática – com predomínio da bilirrubina não conjugada (indireta) e icterícia colestática – com predomínio da bilirrubina conjugada (direta). É clinicamente visível a icterícia quando a concentração de bilirrubina for maior que 5 mg/dL (MURAHOVSKI, 2013).

● **Relação entre Biotinidase, Bilirrubina e Idade Gestacional**

O artigo clássico “Hiperbilirrubinemia no RN”, de 1941 (Journal of Diseases of Childhood 61:958,1941) de Davdson e colaboradores documentou os erros positivos e negativos da avaliação usual da icterícia. O estudo envolveu 132 RN, dos quais 99 foram examinados diariamente. Embora tenha sido encontrado um paralelismo entre dosagem sérica de bilirrubina e a clínica, houve uma ampla variedade de discrepâncias: um RN teve icterícia visível com 3 mg% e outro, sem icterícia aparente com 10 –12 mg%.

Soumarla et al. (1987) concluíram que RN prematuros com função hepática alterada, apresentavam diminuição da atividade da enzima biotinidase. Os nascimentos pré-termo, nos países desenvolvidos, estão, em sua maioria, relacionados ao baixo peso ao nascer (BPN), considerado menor que 2.500 gramas (Tourinho et al., 2013). A partir do estudo de Soumarla et al. (1987) e Schulpis et al. (2003), ao analisarem RN ictericos (a termo, prematuros e bebês com poucas semanas de vida) com o objetivo de determinar a ação da bilirrubina na atividade da biotinidase, constataram que a atividade da biotinidase em todos os grupos avaliados, com níveis de BT sanguíneos acima de 12 mg/dL, diminuiu de forma equânime, alcançando a atividade mínima (1/2 a 1/3 dos controles). O grupo controle deste estudo foi formado por RN que apresentavam níveis de Bilirrubina Total (BT) na faixa de 1 a 4 mg/dL.

Além disso, em todos os RN ictericos estudados, houve uma correlação inversa entre a atividade da enzima, os níveis de enzimas hepáticas e os níveis de BT (SCHULPIS et al., 2003).

Foi realizado ainda um estudo *in vitro*, que avaliou a atividade da biotinidase sérica após a pré-incubação com bilirrubina em concentrações diversas (2, 10 e 15 mg/dL), a 37°C, durante 25 minutos. Os resultados mostraram uma inibição da enzima (-50%) a partir da concentração de 10 mg/dL, sugerindo a possibilidade da bilirrubina, por sua hepatotoxicidade, inibir a atividade da biotinidase (SCHULPIS et al., 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar se os níveis sanguíneos de bilirrubina interferem na atividade da enzima biotinidase em RNs a termo e pré-termo tardios ictericos.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar a atividade da enzima biotinidase em RN a termo e Pré-termo tardios com icterícia neonatal;
- Avaliar associação entre enzimas marcadoras da função hepática (AST e ALT) e a enzima biotinidase.
- Estabelecer protocolos para o seguimento dos pacientes com deficiência de biotinidase;

2. JUSTIFICATIVA

A triagem genética em populações um método que objetiva identificar indivíduos com maior suscetibilidade ou risco para a ocorrência de uma doença genética em grupos populacionais. É uma estratégia importante em saúde pública e terá maior impacto à medida que os testes de triagem aumentarem em número de patologias testadas e melhorarem sua qualidade de detecção de possíveis casos positivos para as nosologias estudadas. Na prática médica, porém, a decisão de triar os indivíduos para este fim, repousa na validade e utilidade clínicas do teste. A primeira é a extensão em que um resultado de teste se mostra preditivo de doença. A segunda, representa o grau em que um resultado de teste interferirá no cuidado médico que um paciente irá receber e, assim, permitirá melhor desfecho clínico e econômico para o indivíduo (THOMPSON & THOMPSON (2008).

Criado pelo Ministério da Saúde em 2001, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) objetiva detectar, confirmar o diagnóstico, tratar e acompanhar os casos das seguintes patologias, conforme as fases de implantação do programa estabelecidas em cada Estado. São elas: Fase I: Fenilcetonúria (PKU) e Hipotireoidismo Congênito (HC); Fase II: PKU, HC e Hemoglobinopatias; Fase IV: PKU, HC, Hemoglobinopatias e Fibrose Cística. O Estado do Pará foi habilitado recentemente para a Fase IV que inclui PKU, HC, Hemoglobinopatias, Fibrose Cística, Hiperplasia Adrenal Congênita e Deficiência de Biotinidase.

A Portaria Nº 2.829, de 14 de dezembro de 2012 referente à Fase IV no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), instituído pela Portaria nº 822/GM/MS, de 6 de junho de 2001, inclui hipertrofia adrenal congênita e deficiência de biotinidase. Tais doenças já fazem parte dos programas de triagem neonatal da maioria dos estados norte-americanos (THOMPSON & THOMPSON, 2008).

A triagem neonatal, assim, é uma ação primária dos programas de saúde pública realizada na população com idade entre 0 e 30 dias de vida. Tem como benefício a detecção precoce de doenças graves e tratáveis em fase pré-sintomática, prevenindo desfechos como retardo mental ou mesmo óbito. Existem patologias, no entanto, para as quais a triagem neonatal terá seu impacto diminuído.

Dessa forma, justifica-se a realização desta pesquisa como forma de investigar o real impacto da inclusão da Deficiência de Biotinidase no Programa Nacional de Triagem Neonatal. Resultados falso positivo gerados por interferentes como a bilirrubina, que está na gênese da Icterícia Neonatal, dão margem para questionamento sobre o real impacto em saúde pública desta triagem e a melhor maneira de realização do manejo dos casos identificados. Logo, busca-se obter mais dados que contribuam para avanços no conhecimento científico e respaldem os profissionais de saúde a lidar adequadamente com essa realidade.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Caracterização da amostra analisada

Trata-se de um estudo caso controle e prospectivo. Para investigar a provável atuação da bilirrubina sobre a atividade da enzima biotinidase, foram avaliados dois grupos de RN: RN a termo e RN Pré-termo Tardios.

As amostras aleatórias simples foram retiradas da população de modo casual, randômico e se caracterizaram pelo fato de cada unidade ter a mesma chance de ser escolhida. As amostras de sangue de RN com icterícia foram provenientes do Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. Participaram do estudo 103 recém-nascidos: 92 RN a termo (23 icterícos e 69 anictéricos) e 11 RN pré-termo tardios (3 icterícos e 8 anictéricos), com 48 a 96 horas de vida. A coleta de dados ocorreu por amostra aleatória de RNs da ala de Alojamento Conjunto do referido hospital e por um único médico. OS RN foram posteriormente classificados quanto à idade gestacional, o sexo e o peso ao nascer.

4.2. Critérios de exclusão e inclusão

Considerou-se como critério de exclusão RN com malformação congênita grave; prematuridade extrema ou pós-maturidade; diabete materna; asfixia ao nascimento; sepse ou hiperbilirrubinemia do tipo hemolítico devido à incompatibilidade de grupo sanguíneo (Rh ou ABO); RN que receberam fototerapia convencional ou intensiva antes da coleta de sangue; RN nos quais o nível de bilirrubina plasmática total tinha aumentado em mais de 5 mg/dL por dia ou era maior que 24 mg/dL nas primeiras 24 horas após o nascimento; RN com sinais e sintomas sugestivos de doença grave. Foram incluídos os RN sem fatores etiológicos de risco.

4.3. Coleta, Conservação e Transporte das Amostras

O material biológico colhido (sangue periférico) foi obtido por punção venosa. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos de ensaio e cuidadosamente protegidas da luz, pois a bilirrubina é um metabólito fotossensível,

e, posteriormente, conservadas em caixa isotérmica (isopor), para que fossem transportadas ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da UFPA. No LAC, as amostras de sangue foram centrifugadas, a 2000 rpm durante cinco minutos, para a completa separação entre o soro e outros componentes do sangue, utilizando centrífuga refrigerada. Após, foram dosadas bilirrubina total e frações (BT, BD e BI) e as transaminases Alanino aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST). Posteriormente, as mesmas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM/UFPA), onde foi realizado o ensaio para a enzima Biotinidase.

4.4. Aspectos Éticos

Este trabalho foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (CEP/FSCMPA) e levou em consideração os princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça.

É conveniente ressaltar que todas as amostras de sangue utilizadas neste estudo foram coletadas de acordo com a concordância dos pais dos pacientes, que também assinarão os termos de Assentimento e de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B).

4.5. Ensaio Enzimático de Biotinidase em Soro

A análise da atividade da enzima biotinidase foi realizada pelo método descrito por Knappe et al. (1963). Através desse método foi possível determinar a liberação de p -aminobenzoato (PABA) a partir do substrato artificial N-biotinil- p -aminobenzóico (B-PABA), um análogo da biocitina. Para ser identificado, o PABA liberado sofre diazotização. Portanto, na presença de atividade debiotinidase, ao final da reação, é possível visualizar uma cor púrpura. Na ausência de atividade de biotinidase é possível visualizar uma cor púrpura de intensidade baixa ou nenhuma cor.

Realizou-se a análise em duplicata, amostra teste e branco com a leitura das amostras foi feita em absorbância com comprimento de onda de 546 nm. A atividade da enzima se dá pelo cálculo $\Delta \text{Abs} \times 9,51$ (nmol/min/mL), no qual 9,51 referem-se à constante da equação (KNAPPE et al., 1963).

Baseado na metodologia de Knappe et al. (1963), os valores de referência da atividade de biotinidase (nmol/min/mL) usando soro, são os seguintes:

- Atividade de biotinidase normal: 4,0 – 10,0 (Kobayashi, 2003)
- Heterozigotos: 2,2 – 5,2 (Hommes, 1991)
- Deficiência parcial: 0,7 - 2,1 (Hommes, 1991)
- Deficiência de biotinidase < 0,7 (Hommes, 1991)

4.6. Dosagem de Bilirrubina Total e Frações

A análise quantitativa da bilirrubina sérica (BD e BT) foi realizada pelo método de Sims Horn (DOLES), o qual permite a dosagem de BD (diglicurônide) em meio aquoso e de BT (BD e BI) por ação de um reagente de ação catalisadora. A detecção dessas bilirrubinas ocorre por diazotização e formação de azobilirruina vermelha.

Valor de referência – hiperbilirrubinemia: > 5 mg/dL (TIKMANI et al., 2010) é baseado nos gráficos dos níveis de bilirrubina que apresentação risco de hiperbilirrubinemia para o RN, conforme estudado por Bhutani; Johnson e Sivieri (1999).

4.7. Dosagem de Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanino Aminotransferase (ALT)

A dosagem das enzimas aminotransferases foi realizada pelo método cinético de tempo fixo e medição de ponto final, *Kit* da empresa DOLES, o qual detecta a formação de oxalacetato (por ação da AST) e piruvato (por ação da ALT), que são medidos através da formação de hidrazona de intensa cor em meio alcalino.

Valores de referência: AST: 12- 42 UI/L (37°C)

ALT: 8 – 42 UI/L (37°C)

4.8. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com os softwares BioEstat Versão 5.0. Além da estatística descritiva, aplicou-se a estatística analítica por meio dos testes Qui-Quadrado Aderência para variáveis categóricas, *t* de Student para verificação da diferença entre as médias aritméticas nos resultados laboratoriais e Teste McNemar para verificação da concordância entre os diagnósticos clínicos e laboratoriais. Admitindo um nível de significância $\alpha = 0.05$ ou 5% para rejeição da hipótese de nulidade.

5. RESULTADOS

5.1 Dados de Identificação

Excluiu-se do estudo 12 amostras, sete delas por apresentarem quantidade insuficiente de material biológico para a realização de todas as testagens e 5 por hemólise, perfazendo um total de 91 casos válidos em todo o estudo.

A tabela 1 apresenta os 91 recém-nascidos estudados, distribuídos quanto à idade gestacional e ao peso ao nascer, sendo significativo o percentual de crianças a termo (89%), com peso normal (79,1%) ($p < 0,001$).

Tabela 1. Recém-nascidos classificados segundo a idade gestacional (expressa em semanas) e o peso de nascimento (expresso em gramas).

IDENTIFICAÇÃO	Frequência	% (N=91)	p-valor
Idade Gestacional			< 0,001*
Pré-termo	10	11,0%	
Termo	81	89,0%	
Peso			< 0,001*
Baixo peso	19	20,9%	
Normal	72	79,1%	

Fonte: ALCON/FSCMPA

*Qui-Quadrado Aderência

5.2. Dados Clínico-Laboratoriais

A tabela 2 apresenta a média dos valores encontrados nos exames laboratoriais realizados em pacientes ictericos. Foram quantificadas: Biotinidase, Bilirrubina Total (BT), Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Indireta (BI), Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanino Aminotransferase (ALT).

Tabela 2. Recém-nascidos ictericos avaliados laboratorialmente.

GRUPO A - ICTÉRICOS (N=23)

EXAMES LABORATORIAIS	Mínimo	Máximo	Média	DP
BIOTINIDASE	0.2	5.4	3.1	± 1.4
BT	5.6	20.0	10.9	± 3.8
BD	0.9	3.4	1.8	± 0.6
BI	4.2	18.0	9.1	± 3.7
AST	28.0	164.0	64.4	± 33.3
ALT	1.0	18.0	7.0	± 5.5

Fonte: ALCON/FSCMPA. Valores de biotinidase expressos em nmol de PABA/min/mL. Valores de bilirrubina e das enzimas AST e ALT expressos em mg/dL e UI/L, respectivamente. Valores de referência para biotinidade: 4,0 a 10 nmol PABA/min/mL, para BT: < 5mg/dL, para AST: 12 – 42 UI/L, para ALT: 8 – 42 UI/L.

Na tabela 3 observa-se a média dos valores encontrados nos exames laboratoriais realizados em pacientes anictéricos. Foram dosadas: a Biotinidase, a Bilirrubina Total (BT), a Bilirrubina Direta (BD), a Bilirrubina Indireta (BI), a Aspartato Aminotransferase (AST) e a Alanino Aminotransferase (ALT) em 68 casos válidos.

Tabela 3. Recém-nascidos anictéricos avaliados laboratorialmente.

GRUPO B – ANICTÉRICOS (N=68)				
EXAMES LABORATORIAIS	Mínimo	Máximo	Média	DP
BIOTINIDASE	0.5	5.1	2.7	± 1.1
BT	3.0	14.7	8.5	± 2.7
BD	0.9	4.7	1.8	± 0.7
BI	0.7	13.0	6.7	± 2.6
AST	27.0	217.0	64.2	± 30.7
ALT	1.0	32.0	7.3	± 6.1

Fonte: ALCON/FSCMPA. Valores de biotinidase expressos em nmol de PABA/min/MI. Valores de bilirrubina e das enzimas AST e ALT expressos em mg/dL e UI/L, respectivamente. Valores de referência para biotinidade: 4,0 a 10 nmol PABA/min/mL, para BT: < 5mg/dL, para AST: 12 – 42 UI/L, para ALT: 8 – 42 UI/L.

A tabela 4 mostra os 91 RN distribuídos quanto ao diagnóstico clínico, sendo o percentual significativo de anictéricos, com 74,7%.

Tabela 4. Recém-nascidos avaliados clinicamente quanto à icterícia.

GRUPOS	Freq	%
Ictéricos	23	25.3%
Anictéricos	68	74.7%
TOTAL	91	100.0%

Fonte: ALCON/FSCMPA

*p < 0,001 Teste Qui-Quadrado Aderência.

A tabela 5 mostra os 91 RN distribuídos quanto ao diagnóstico clínico-laboratorial, indicando uma discordância significativa pelo teste de McNemar (*p < 0,001) em 68,1% dos casos, ou seja, 62 pacientes clinicamente anictéricos, são, laboratorialmente ictéricos. Importante perceber que todos os pacientes ictéricos segundo a avaliação clínica apresentaram, laboratorialmente, confirmação de sua icterícia.

Tabela 5. Recém-nascidos avaliados clínica e laboratorialmente quanto à icterícia.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL			
	Ictérico		Anictérico	
Ictérico	23	25.3%	0	0.0%
Anictérico	62	68.1%	6	6.6%

Fonte: ALCON/FSCMPA

*p < 0.001 Teste McNemar

Na tabela 6, os 91 recém-nascidos foram distribuídos quanto ao diagnóstico clínico, sexo e atividade da enzima biotinidase, onde o teste estatístico não mostrou diferença significativa entre as variáveis analisadas, mediante a aplicação do teste de t Student.

Tabela 6. Recém-nascidos ictéricos e anictéricos, distribuídos quanto ao sexo e avaliados quanto à atividade da enzima Biotinidase (expressa em nmol PABA/min/mL).

GRUPO	FEMININO (N=43)					MASCULINO (N=48)					p-valor
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	
Ictéricos	11	0.4	5.4	2.9	± 1.4	12	0.2	5.2	3.3	± 1.4	0.2440
Anictéricos	3	0.5	4.5	2.7	± 1.2	36	0.7	5.1	2.6	± 1.1	0.4014
t Student			0.3529					0.0511			-----

Fonte: ALCON/FSCMPA.

A tabela 7 mostra os 91 recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à atividade da enzima biotinidase. A atividade de biotinidase não se alterou significativamente ($p = 0.0767$) entre os grupos, mediante a aplicação do teste de t Student.

Tabela 7. Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à atividade da enzima Biotinidase (expressa em nmol PABA/min/mL).

GRUPOS	N	BIOTINIDASE			
		Mínimo	Máximo	Média	DP
Ictéricos	23	0.2	5.4	3.1	± 1.4
Anictéricos	68	0.5	5.1	2.7	± 1.1
GERAL	91	0.2	5.4	2.8	± 1.2

Fonte: ALCON/FSCMPA
 $p = 0.0767$ Teste t Student

A tabela 8 mostra os 91 RN ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Bilirrubina total (BT), indicando que houve diferença significativa ($p < 0,045$) da média dos valores entre os grupos, sendo de 10,9 mg/dL nos ictericos e de 8,5 mg/dL nos anictéricos, segundo o teste de t Student.

Tabela 8. Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Bilirrubina total (BT) (expressa em mg/dL).

GRUPOS	N	BT mg/DL			
		Mínimo	Máximo	Média	DP
Ictéricos	23	5.6	20.0	10.9	± 3.8
Anictéricos	68	3.0	14.7	8.5	± 2.7
GERAL	91	3.0	20.0	9.1	± 3.2

Fonte: ALCON/FSCMPA
 $*p = 0.0045$ Teste t Student.

A tabela 9 mostra os 91 RN ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Bilirrubina direta (BD). Não houve diferença estatística considerando estas variáveis nos dois grupos.

Tabela 9. Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Bilirrubina direta (BD) (expressa em mg/dL).

GRUPOS	N	BD mg/DL			
		Mínimo	Máximo	Média	DP
Ictéricos	23	0.9	3.4	1.8	± 0.6
Anictéricos	68	0.9	4.7	1.8	± 0.7
GERAL	91	0.9	4.7	1.8	± 0.6

Fonte: ALCON/FSCMPA
NSA TESTE ESTATÍSTICO

A tabela 10 mostra os 91 RN ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Bilirrubina indireta (BI). Houve diferença significativa ($p = 0.0036$) na média entre os grupos, a saber: 9,1 mg/dL entre os ictericos e 6,7 mg/dL entre os anictéricos, através da aplicação do teste de t Student.

Tabela 10. Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Bilirrubina indireta (BI).

GRUPOS	N	BI mg/DL			
		Mínimo	Máximo	Média	DP
Ictéricos	23	4.2	18.0	9.1	± 3.7
Anictéricos	68	0.7	13.0	6.7	± 2.6
GERAL	91	0.7	18.0	7.3	± 3.1

Fonte: ALCON/FSCMPA
* $p = 0.0036$ Teste t Student

A tabela 11 mostra os 91 RN ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Aspartato Aminotransferase (AST). Não houve diferença significativa entre as médias observadas nos dois grupos.

Tabela 11. Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Aspartato Aminotransferase (AST).

GRUPOS	N	AST UI/L			
		Mínimo	Máximo	Média	DP
Ictéricos	23	28.0	164.0	64.4	± 33.3
Anictéricos	68	27.0	217.0	64.2	± 30.7
GERAL	91	27	217.0	64.3	± 31.2

Fonte: ALCON/FSCMPA
 $p = 0.4887$ Teste t Student

A tabela 12 mostra os 91 recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Alanino Aminotransferase (ALT). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Tabela 12. Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à dosagem da Alanino Aminotransferase (ALT)

GRUPOS	ALT UI/L				
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP
Ictéricos	23	1.0	18.0	7.0	± 5.5
Anictéricos	68	1.0	32.0	7.3	± 6.1
GERAL	91	1.0	32.0	7.2	± 5.9

Fonte: ALCON/FSCMPA
p = 0.4033 Teste t Student

Tabela 13. Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto ao sexo e avaliados quanto à atividade da AST (expressa em UI/L).

GRUPO	FEMININO (N=43)					MASCULINO (N=48)					p-valor
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	
Ictéricos	11	28	164	76,0	± 43,4	12	37	98	58,2	± 16,4	0,1027
Anictéricos	3	27	217	65,1	± 35,1	36	33	145	65,0	± 26,7	0,4981
t Student	0,1954					0,1431					-----

Fonte: ALCON/FSCMPA.

A tabela 13 mostra os 91 RNs ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à atividade da enzima AST. A atividade da enzima não sofreu alteração significativa entre os grupos, mediante a aplicação do teste de t Student.

Tabela 14. Recém-nascidos ictericos e anictéricos, distribuídos quanto ao sexo e avaliados quanto à atividade da ALT (expressa em UI/L).

GRUPO	FEMININO (N=43)					MASCULINO (N=48)					p-valor
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	
Ictéricos	11	1,0	18	7,1	± 5,8	12	1,0	16	6,9	± 5,0	0,4567

Anictéricos	3 2	1,0	32	7,6	± 6,2	36	1,0	26	6,8	± 5,9	0,2875
t Student	0,394					0,4877					-----

Fonte: ALCON/FSCMPA.

A tabela 14 mostra os 91 RNs ictericos e anictéricos, distribuídos quanto à atividade da enzima ALT. A atividade da enzima não sofreu alteração significativa entre os grupos, mediante a aplicação do teste de t Student.

6. DISCUSSÃO

A biotina é uma vitamina hidrossolúvel, fundamental para a ação de enzimas denominadas carboxilases. Estas, por sua vez, são essenciais ao funcionamento de diversas rotas metabólicas responsáveis pela metabolização de substâncias orgânicas (glicose, ácidos graxos, aminoácidos) que os seres humanos precisam para a sua perfeita homeostase. A deficiência dessa vitamina leva a sintomas como hipotonia, ataxia, convulsões, atraso no desenvolvimento e alterações dermatológicas como a dermatites seborréica e alopecia areata (ZEMPLINI; MOCK, 1999; MORENO-ARANGO et al., 2005).

A deficiência de biotina é produzida principalmente pela alteração na atividade da enzima responsável pela sua reciclagem endógena: a biotinidase. A deficiência de biotinidase pode ocorrer devido a um erro metabólico hereditário: uma mutação no gene que codifica a enzima. Porém, estudos revelaram outros fatores como responsáveis pela deficiência, dentre eles, destaca-se o excesso de bilirrubina, encontrada em recém-nascidos ictericos (SCHULPIS et al., 2003).

Neste estudo 91 recém-nascidos foram distribuídos quanto à idade gestacional em RN pré-termo tardios e termo e, quanto ao peso ao nascer, em peso normal e baixo peso, sendo significativo o percentual de crianças a termo (89%), com peso normal (79,1%), através da aplicação do Teste Qui-quadrado, com $p < 0.001$. Tais resultados são compatíveis com a origem da amostra – Alojamento Conjunto/FSCMPA, setor do hospital onde permanecem internados o binômio mãe-bebê nas situações em que ambos estão em boas condições de saúde e com baixo risco de complicações, aguardando apenas o tempo mínimo de observação preconizado pelo Ministério da Saúde Brasileiro para a alta, que, para os recém-nascidos, é de 48 horas, independentemente do tipo de parto, contadas a partir do horário de nascimento.

Rugolo (2011) refere que os recém-nascidos pré-termo tardios – RN - PTT (34 – 36 semanas e 6 dias de gestação), geralmente têm peso acima de 2500 g e representam mais de 70% dos nascimentos prematuros, sendo imaturos fisiológica e metabolicamente, apresentando elevada morbimortalidade.

Foram quantificadas no soro a Biotinidase, a Bilirrubina Total (BT), a Bilirrubina Direta (BD), a Bilirrubina Indireta (BI), a Aspartato Aminotransferase (AST) e a Alanino Aminotransferase (ALT) em 23 RN considerados ictericos. A média para a dosagem de Biotinidase foi de 3,1 nmol de PABA/min/mL, de Bilirrubina total 10,9 mg/dL, de Bilirrubina direta (BD) 1,8 mg/dL, de Bilirrubina indireta de 9,1 mg/dL, de AST 64,4 UI/L e de ALT 7,0 UI/L. Os valores encontrados para Biotinidase e ALT pouco se alteraram em relação a normalidade e AST e BT (BD + BI) se encontravam aumentados neste grupo.

O estudo de Schulpis et al. (2003) que avaliou a atividade da biotinidase em pacientes com icterícia (recém-nascidos a termo e prematuros) não explicitou quais os fatores que realmente podem influenciar na atividade enzimática. Esses fatores poderiam ser elevados níveis de bilirrubinas séricas, enzimas aminotransferases (AST e ALT) ou a própria imaturidade hepática que os recém-nascidos apresentam. Além disso, se altos níveis de bilirrubina influenciam na atividade da biotinidase (podendo até mesmo funcionar como um inibidor dessa enzima), os pacientes com icterícia podem apresentar outros sintomas não correlacionados à icterícia. Se realmente isso ocorre, pode-se considerar a suplementação com biotina uma alternativa para reverter a deficiência transitória da biotinidase.

A média dos valores encontrados nos exames laboratoriais realizados em pacientes anictéricos, onde foram avaliadas: a Biotinidase, a Bilirrubina Total (BT), a Bilirrubina Direta (BD), a Bilirrubina Indireta (BI), a Aspartato Aminotransferase (AST) e a Alanino Aminotransferase (ALT) em 68 casos válidos, foi a seguinte: dosagem de Biotinidase foi de 2,7 nmol de PABA/min/mL, de Bilirrubina total, 8,5 mg/dL, de Bilirrubina direta (BT), 1,8 mg/dL, de Bilirrubina indireta, 6,7 mg/dL, de AST, 64,2 UI/L, de ALT, 7,3 UI/L. Os valores para Biotinidase e ALT mantiveram-se praticamente normais e os de BT (BD + BI) e AST, aumentados, embora BT assumindo valores mais baixos em comparação aos encontrados nos clinicamente

ictéricos, o que é esperado para esta população, já que o excesso de bilirrubina indireta é marcante nos ictéricos (SCHULPIS et al., 2003).

O estudo detectou um percentual significativo de anictéricos (74,7%) segundo a avaliação clínica dentre os 91 casos válidos, pois foram excluídos do estudo os pacientes com risco aumentado para hiperbilirrubinemia patológica.

A mesma casuística, quando distribuída quanto ao diagnóstico clínico-laboratorial, mostra uma discordância significativa ($p < 0.001$), entre os diagnósticos em 68,1% dos casos, ou seja, 62 pacientes clinicamente anictéricos, são, laboratorialmente ictéricos. Por outro lado, todos os pacientes ictéricos pertenciam a esta condição tanto segundo a avaliação clínica quanto aos critérios laboratoriais.

Maisels et al. (1999) e Akinpelu et al. (2013), relatam que a icterícia é a patologia neonatal mais comum, ocorrendo em até 60% dos casos, quando as vias normais de metabolismo de excreção da bilirrubina estão alteradas.

Como mencionado anteriormente, Buthani (2006), define a Icterícia neonatal pela concentração sérica de bilirrubina direta (BD) superior a 2,0mg/dL em qualquer momento. A icterícia é clinicamente visível quando a concentração de bilirrubina for maior que 5 mg/dL (MURAHOVSKI, 2013). Ou seja, muitos pacientes ditos anictéricos podem, na verdade, apresentar icterícia, porém apresentando valores ainda não perceptíveis clinicamente.

Por outro lado, os pacientes com icterícia perceptível na avaliação clínica, tiveram tal achado confirmado na avaliação laboratorial, indicando a assertividade da equipe pediátrica atuante neste hospital.

Os RN ictéricos e anictéricos, quando distribuídos quanto à atividade da enzima biotinidase, mostraram que esta não se alterou significativamente ($p = 0.0767$) entre os grupos. Isto pode estar associado a dois fatores: pequeno tamanho amostral e, possivelmente, em função da discordância clínica e laboratorial quanto à definição da icterícia nos RN ditos inicialmente anictéricos.

Houve diferença significativa da média dos valores de BT entre os grupos anictéricos e ictéricos, sendo de 10,9 mg/dL nos ictéricos e de 8,5 mg/dL nos anictéricos. Tais resultados retratam que os clinicamente ictéricos apresentaram dosagens compatíveis com estes achados e que os clinicamente anictéricos, ou

apresentavam icterícia não perceptível clinicamente ou a tinham de forma pouco perceptível, resultando sua análise em níveis laboratoriais compatíveis com uma icterícia fisiológica, com baixo risco de hiperbilirrubinemia significativa.

As médias dos valores de BD ou conjugada, foram iguais entre os grupos, correspondendo a 1,8 mg/dL. Esta bilirrubina depende da ação da enzima glicuroniltransferase para sua produção, sendo que tal enzima apresenta-se em concentrações mais baixas em recém-nascidos prematuros, quando comparados aos de termo (NELSON et al., 2013).

Em relação à BI, foi observada diferença significativa ($p = 0.0036$) na média entre os grupos, a saber: 9,1 mg/dL entre os icterícos e 6,7 mg/dL entre os anictéricos. Maisels et al. (1999) e Bhutani (2006) referem que os valores de BI, na vida intra-uterina, dependem da ação placentária: a BI, resultante da destruição dos eritrócitos senescentes circulantes, é depurada através da placenta para a circulação materna e responde por 75% da produção de bilirrubina diária do RN. Assim, muitos RN apresentam um acúmulo transitório de BI nos primeiros dias de vida.

Em relação à AST, não houve diferença significativa ($p = 0.4887$) na média entre os grupos, sendo de 64,4 UI/L, para os icterícos e de 64,2 UI/L, para os anictéricos. Os valores encontrados foram elevados para ambos grupos, porém semelhantes entre si, apontando para uma possível ação da icterícia, no que se refere às dosagens de AST. A discordância entre a avaliação clínica e os critérios laboratoriais e o tamanho amostral podem ter tido papel importante nestes achados. A média de ALT entre os grupos foi semelhante estatisticamente, sendo de 7,0 UI/L para os icterícos e de 7,3 UI/L para os anictéricos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O ensaio enzimático de Biotinidase em soro não demonstrou inibição significativa da biotinidase, pois os resultados em sua maioria foram de dosagens normais, embora, a média tenha apontado para pacientes heterozigotos. No entanto, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), utiliza a técnica de dosagem em papel filtro. Portanto, o desenvolvimento de pesquisas complementares de comparação entre os métodos, é essencial para poder confirmar os resultados obtidos no estudo *in vitro*.

A deficiência da biotinidase é uma doença metabólica hereditária que foi incluída nos programas de triagem neonatal no Brasil que se encontram na fase IV. Assim, a idade gestacional, o peso ao nascer, concentrações de bilirrubina e a atividade das enzimas hepáticas aminotransferases devem ser considerados fatores que podem interferir sobre a atividade da enzima biotinidase, indicando a necessidade de conhecer e avaliar esses fatores durante a realização da triagem neonatal, evitando, assim, resultados falso-positivos.

Embora o estudo não tenha obtido uma forte correlação entre a atividade da biotinidase e elevados níveis de bilirrubina total, é importante o monitoramento de RN ictéricos, uma vez que essa condição clínica poderá levar a uma alteração transitória da atividade da biotinidase.

Isso foi abordado no estudo brasileiro de Borsatto et al. (2014) e Vanvleck et al. (2015), apontam que a deficiência parcial de Biotinidase é a mais comum no país e um estudo retrospectivo norte-americano apresentado por Jay et al. (2015) acompanhou e tratou com biotina desde o nascimento e durante 25 anos pacientes com deficiência parcial da enzima e os mesmos apresentaram desenvolvimento físico e cognitivo normais, o tratamento com biotina – a ser iniciado ao nascimento, nos casos de deficiência parcial – parece ser a medida mais acertada, até a possível

elucidação diagnóstica do caso, mediante acompanhamento prolongado destes pacientes.

8. CONCLUSÃO

As principais conclusões deste estudo foram:

- Houve uma discordância entre a avaliação clínica e os critérios laboratoriais quanto à classificação da icterícia: 68,1% dos casos anictéricos (62/91) foram considerados laboratorialmente ictericos. Por outro lado, em relação aos ictericos a avaliação clínica concordou com os achados laboratoriais.
- Não houve correlação da enzima biotinidase com as variáveis diagnóstico clínico (icterico e anictérico) e sexo.
- Quanto à dosagem da Bilirrubina total (BT) houve diferença significativa ($p < 0,045$) da média dos valores entre os grupos, sendo de 10,9 mg/dL nos ictericos e de 8,5 mg/dL nos anictéricos.
- Nos RN (a termo e pré-termo tardios), com níveis elevados da enzima Aspartato aminotransferase (AST) e níveis próximos do valor mínimo normal, para a Alanino aminotransferase (ALT), a atividade da biotinidase manteve-se em níveis normais. Os valores aumentados de AST e praticamente normais de ALT, não influenciaram na atividade da enzima, quer em ictericos, quer em não ictericos.
- Sugere-se a prescrição de reposição de biotina para pacientes triados positivamente para deficiência de biotinidase pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal até a completa elucidação diagnóstica do caso – uma vez que múltiplos interferentes podem gerar resultados falso positivo; o que pode ocasionar incertezas familiares quanto ao diagnóstico de uma doença grave, e até fatal, porém tratável e assintomática se diagnosticada o mais precocemente possível.

▪ Não foi possível o estabelecimento de um protocolo para o seguimento dos pacientes com a deficiência de biotinidase, devido: a necessidade de um tamanho amostral maior para esta finalidade e a identificação da necessidade de pesquisas comparativas dos métodos diagnósticos - uma vez que este trabalho foi realizado pela técnica de ensaio enzimática em soro e o Programa Nacional de Triagem Neonatal o faz mediante a técnica de dosagem em papel filtro.

REFERÊNCIAS

AYRES, M.; LEMOS, J. A. **Elementos Epidemiológicos e Bioestatísticos**. Belém,PA, 2012.

AKINPELU, O. V.; WAISSBLUTH, S.; DANIEL, S. J. Auditory risk of hyperbilirubinemia in term newborns: a systematic review. **Int. J. Pediatr. Otorhinol.**, v. 77, p.898-905, 2013.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. Funções hepáticas especializadas. In: **Bioquímica Médica**. São Paulo: Elsevier, 2011.

BHUTANI, V.K.; JOHNSON, L.H.; BROWN, A.K. System-based approach to management of neonatal jaundice and prevention of kernicterus. **J. Pediatr.**, v.140, p.396-403, 2002.

BHUTANI, V.K.; JOHNSON, L.H.; SIRIERI, E.M. Predictive ability of a predischage hour specific serum bilirubin for subsequent significant hiperbilirubinemia in health term and near-term. **Pediatrics**, v.103, p. 6, 1999.

BHUTANI, V.K.; JOHNSON, L.H. Guidelines for management of the jaundice term and near-term infant. **Clin. Perinatol.**, v. 25, p. 555, 1998.

BHUTANI, V.K.; JOHNSON, L.H. Manejo da hiperbilirubinemia no recém-nascido pré-termo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NEONATOLOGIA, 5., Rio de Janeiro, 2006. **Boletim Informativo Pediátrico (BIP)**, Brasília, n.69, p. 198-217, 2006.

BHUTANI, V.K.; JOHNSON, L.H. Novas perspectivas no manejo da icterícia do RN a termo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NEONATOLOGIA. 1., Rio de Janeiro, 1999.

BHUTANI, V.K.; JOHNSON, L.H. Prevenção de hiperbilirrubinemia neonatal grave em lactentes saudáveis com 35 ou mais semanas de gestação: implantação de uma abordagem sistemática, **J. Pediatr. (Rio J.)**, v.83, n.4, July/Aug. 2007.

BORSATTO, T.; SPERB-LUDWIG, F.; PINTO, L. L. C.; DE LUCA, G. L.; CARVALHO, F. L.; DE SOUZA, C. FM.; DE MEDEIROS, P. FV.; LOURENÇO, C. M.; LO FILHO, R.; C NETO, E.; BERNARDI, P.; LEISTNER-SEGAL, S.; SCHWARTZ, I. VD. Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 brazilian patients. **BMC Med. Genet.**, v.15, p. 96, set. 2014.

BURTZ, C.A.; ASHWOOD, E.R. Tietz. **Fundamentos de Química Clínica**. São Paulo: Elsevier, 2008.

CHAPMAN-SMITH, A.; CRONAN J.R., J.E. Molecular Biology of biotinattachment to proteins. **J. Nutr.**, v. 129, 2S Supl., p. S477-S484, 1999.

DOVE 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. **Anal. Biochem.**, v.179, p. 371-74, 1999.

HAYAKAWA, K.; OIZUMI, J. Determination of biotinidase activity by liquid chromatography with fluorimetric detection. **J. Chromatogr.**, v.383, p.148-52, 1986.

HEARD, G. S.; SECOR MCVOY, JR.; WOLF B. A scrining method for biotinidase deficiency in newborns. **Clin. Chem.**, v.30, p.125-127, 1984.

JAY, A.M.; CONWAY, R.L.; FELDMAN, G.L.; NAHHAS, F.; SPENCER, L.; WOLF, B. Outcomes of individuals with profound and partial biotinidase deficiency ascertained by newborn screening in Michigan over 25 years. **Genet. Med.**, v.17, 205-209, 2015.

KELNAR, C.J.K.; HARVEY, D.; SIMPSON, C. Ictericia. In: **O Recém Nascido Doente**: diagnóstico e tratamento em Neonatologia. 3.ed. São Paulo, SP: Santos, 2001.p.277.

KNAPPE, J.; WENGER, G.; WIEGAND, U. On the structure of carboxylated beta-methylcrotonyl carboxylase (CO₂-biotin enzyme). **Biochem. Zeitsch.**, v. 337, p. 232, 1963.

KIM, C. A.; ALBANO, L. M. J.; BERTOLA, B. R. Genética na Prática Pediátrica. In: **Erros Inatos do Metabolismo**. São Paulo, SP: Manole, 2010. p. 476.

KOBAYASHI, H.; SATOMI, K.; STAR, R.A.; WALDMANN, T. A.; BRECHBIEL, M.W.; ANDCHOYKE, A.L. Activated clearance of a biotinylated macromolecular MRI contrast agent from the blood pool using an avidin chase. **Bioconjugate Chem.**, v. 14, n. 5, p. 1044-1047, 2003.

LARA, M.T.; AGUIAR, M.J.B.; GIANNETTI, J.G.; JANUÁRIO, J.N. Deficiência de biotinidase: aspectos clínicos, diagnósticos e triagem neonatal. **Rev. Med. Minas Gerais**, v.24, p.3, p. 388-396, 2014.

MAISELS, M.J. Icterícia. In. AVERY, G.B.; FLETCHER, M.A.; MACDONALD, M.G. **Neonatologia: fisiopatologia e tratamento do recém-nascido**. 4. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999, p. 630-726.

MAISELS, M.J. Risk assessment and follow-up are the keys to preventing severe hyperbilirubinemia. **J. Pediatr.** (Rio J.), v.87, n.4, p.275-276, july/aug. 2011.

MAISELS, M.J.; KRING, E. Length of stay, jaundice, and hospital readmission. **Pediatrics**, v. 101, p. 995, 1998.

MARCONDES, E.; VAZ, F.A.C.; RAMOS, J.L.A.; OKAY, Y. Icterícia do Recém-Nascido. In: **Pediatra Básica Tomo I – Pediatria Geral e Neonatal**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2003, p.466- 478.

McMAHON, R. Biotin in metabolism and molecular biology. **Annu. Rev. Nutr**, v.22, p. 221-39, 2002.

MENDES, L.C.; SANTOS, T.T.; BRINGEL, F.A. Evolução do Programa de Triagem Neonatal no Estado do Tocantins. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.57, n.2, 2013.

MURAHOVSKI, J. Icterícia na Infância. In: **Pediatria: diagnóstico + tratamento**. 7. ed. São Paulo: Sarvier, 2013. p 602-603.

NELSON, W.E.; KLIEGMAN, R.M.; K.J.; JEASON, H.B.; BEHRMAN, R.E. **Tratado de Pediatria**. 19.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NYHAN, W.L. Inborn Errors of Biotin metabolism. **Arch. Dermatol.**, Chicago (EUA), v. 123, p. 1696 –1698, 1987.

RAMOS, J.L.A.; VAZ, F.A.C.; ARAUJO, M.C.K.; DEUTSCH, A. **Icterícia do recém-nascido**. In: **Pediatria básica Tomo I: Pediatria geral e neonatal**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2003. p.466- 478.

RIGHETTO, A.L.C.; TURCATO, M.F.; ANSELMO, J.N.N.; JOTHA, M.C.D.; SANTOS, C.D.; GARCIA, D.F. et al. Erros inatos do metabolismo confirmados no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – SP no período de 2000 a 2008. **Medicina Ribeirão Preto(SP)**, v.43, n.4, p.419-26, 2010.

RUGOLO, L.M.S.S. **Manejo do Recém-nascido Pré-termo tardio: peculiaridades e cuidados especiais**. p. 1, 2011. Disponível em:<http://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/pdfs/Pre-termo-tardio-052011.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2017.

SCHULPIS, K.H.; GAVRILI, S.; TJAOURANIS, J.; KARIKAS, G.A.; KAPIK, A.; COSTALOS, C. The effect of neonatal jaundice on biotinidase activity. **Early Hum. Dev.**, v.72, n.1, p. 15-24, 2003.

SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLED, D. **The Metabolic Basic of Inherited Disease**. 8. ed. New York(EUA): Mc Graw-Hill, 2001, p. 3938.

SENANAYAKE, D.N.; JASINGE, E.A.; PINDOLIA, K.; WANIGASINGHE, J.; MONAGAN,K.; SUCHY, S.F.;WEI, S.; JAYSENA S.; WOLF B. First contiguous gene deletion causing biotinidase deficiency: The enzyme deficiency in three Sri Lankan children. **Mol. Genet. Metab. Rep.**, v. 2, p. 81-84, mar. 2015.

SOURMALA, T.; WICK, H.; BAUMGARTNER, E.R. Low biotinidase activity in plasma of some preterm infants: Possible source of false-positive screening results. **Eur. J. Pediatr.**,v. 147, n.5, p. 363-382, 1987.

SOUZA, E.R.D. **Caracterização cinética da enzima biotinidase no sangue de humanos**. Belém, 2005. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Pará. Belém, 2005.

THOMPSON & THOMPSON. **Medicina Genética Personalizada**. In: **Genética Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, p.417- 428.

TOURINHO, A.B.; REIS, M.L.B.S. **Peso ao Nascer: uma abordagem nutricional**. **Com. Ciências Saúde**, v.22, n.4, p. 19-30, 2013.

VANVLECK, N.; WOLF, B.; SEETERLIN, M.; MONAGHAN, K.G.; STANLEY, E.; HAWKINS, H.; TAFFE, B. Improved identification of partial biotinidase deficiency by newborn screening using age-related enzyme activity cutoffs: Reduction of False-Positive Rate. **Int. J. Neonatal Screen.**, v. 1, p.45-56, 2015.

WANG, X.; CHOWDHURY, J.R.; CHOWDHURY, N.R. Bilirubin metabolism: applied physiology. **Curr. Pediatr.**, v. 16, p. 70-74, 2006.

WOLF, B. Biotinidase: its role in biotinidase deficiency and biotin metabolism. **J. Nutri. Biochem.**, v.10, p. 441-445, 2005.

WOLF, B. Biotinidase deficiency: "if you have to have an inherited metabolic disease, this is the one to have". **Genet. Med.**, v. 14, p. 565-575, 2012.

WOLF, B. The story of biotinidase deficiency and Its Introduction into Newborn Screening: The Role of Serendipity. **Int. J. Neonatal. Screen.**, v. 1, p. 3-12, 2015.

ZEMPLINI, J.; MOCK, D.M. Biotin biochemistry and human requirements. **J. Nutr. Biochem.**, v.10, p. 128-138, 1999.

APÊNDICE A – TERMO DE ASSENTIMENTO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

TERMO DE ASSENTIMENTO

(Baseada na Resolução Nº 466 de 12/12/2012 do Conselho Nacional de Saúde)

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“ICTERÍCIA EM LACTENTES PREMATUROS PODE INTERFERIR NA ATIVIDADE DA ENZIMA BIOTINIDASE ?”**.

A natureza e objetivo do projeto de pesquisa foram explicadas a mim. Eu compreendo e concordo em participar.

Eu compreendo que para participar deste estudo, o responsável por mim deverá autorizar e assinar um termo de consentimento.

Eu compreendo que eu não terei nenhum custo, nem vou receber qualquer vantagem financeira.

Eu compreendo que serei esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar e estou livre para participar ou recusar.

Eu compreendo que o meu responsável poderá retirar o consentimento ou interromper a minha participação a qualquer momento. A minha participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que sou atendido (a) pelo pesquisador que irá tratar a minha identidade com padrões profissionais de sigilo.

Eu compreendo que não serei identificado em nenhuma publicação. Este estudo apresenta risco mínimo, isto é, o mesmo risco existente em atividades rotineiras como conversar, tomar banho, ler etc. Apesar disso, asseguram-me o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

Eu compreendo que os resultados estarão a minha disposição quando finalizada.

Eu compreendo que este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, eu estou ciente que devo guardar uma cópia do Termo de Assentimento, quando completo.

Eu estou ciente que tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Belém, ____ de _____ de 20 ____ .

Assinatura do (a) menor

Assinatura do (a) pesquisador (a)

Para maiores informações e esclarecimentos sobre a pesquisa e/ou seus procedimentos, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Carla Leonor Melo Vinagre Machado, pelo e-mail: carleo_med@hotmail.com e tel: Nº (91) 999616206. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (CEP/FSCMPA) para solicitar todos e quaisquer esclarecimentos éticos que lhe convir sobre a pesquisa. O CEP/FSCMPA é localizado a Rua Oliveira Belo, nº 395, Umarizal – CEP: 66050- 380, Belém-Pará, site: www.santacasa.pa.gov.br e tel:40092233.

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(Baseada na Resolução Nº 466 de 12/12/2012 do Conselho Nacional de Saúde)**

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“ICTERÍCIA EM LACTENTES PREMATUROS PODE INTERFERIR NA ATIVIDADE DA ENZIMA BIOTINIDASE ?”**.

Eu compreendo que posso retirar meu filho do estudo em qualquer etapa e que isto não irá afetar os cuidados médicos ou quaisquer outros aspectos da relação recebidos ao meu filho.

Eu compreendo que os riscos associados a esse procedimento são mínimos por que os métodos e práticas são de uso rotineiro.

Eu compreendo que meu filho poderá não ter benefício direto por participar do estudo.

Eu compreendo que não haverá nenhum tipo de despesa para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.

Eu estou ciente de que devo guardar uma cópia do Termo de Consentimento, quando completo. Diante do exposto, com a minha assinatura abaixo prova do meu Consentimento Livre e Esclarecido em participar da pesquisa.

Belém, _____ de _____ de _____

Participante da Pesquisa

Responsável pela Pesquisa

Para maiores informações e esclarecimentos sobre a pesquisa e/ou seus procedimentos, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Carla Leonor Melo Vinagre Machado, pelo e-mail: carleo_med@hotmail.com e tel: Nº (91) 999616206. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (CEP/FSCMPA) para solicitar todos e quaisquer esclarecimentos éticos que lhe convir sobre a pesquisa. O CEP/FSCMPA é localizado a Rua Oliveira Belo, nº 395, Umarizal – CEP: 66050- 380, Belém-Pará, site: www.santacasa.pa.gov.br e tel:40092233.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

FUNDAÇÃO SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DO PARÁ -
FSCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ICTERÍCIA EM RECÉM-NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO TARDIOS PODE INTERFERIR NA ATIVIDADE DA ENZIMA BIOTINIDASE

Pesquisador: Carla Leonor Melo Vinagre Machado

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa em genética do comportamento.);

Versão: 1

CAAE: 57610016.0.0000.5171

Instituição Proponente: Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.762.323

Apresentação do Projeto:

A literatura tem evidenciado que RN prematuros com função hepática alterada, apresentavam diminuição da atividade da enzima biotinidase. Os autores pretendem estudar a atividade da enzima biotinidase em RNs a termo (com 37 a 41 semanas e seis dias de idade gestacional) e Pré-termo tardios (com 34 a 36 semanas e seis dias de idade gestacional) com a finalidade de diferenciar a deficiência de biotinidase transitória, por imaturidade hepática, em prematuros, daquela permanente, por erro inato do metabolismo. O tipo de estudo será observacional analítico, tipo caso-controle. Serão avaliados dois grupos de RN: RN a termo e RN Pré-termo Tardios. As

amostras de sangue de RN com icterícia serão provenientes do Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a atividade da enzima biotinidase em RNs a termo (com 37 a 41 semanas e seis dias de idade gestacional) e Pré-termo tardios (com 34 a 36 semanas e seis dias de idade gestacional).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Na pesquisa haverá riscos inerentes a punção venosa periférica, como hemorragias e etc.

Continuação do Parecer: 1.762.323

Quanto aos Benefícios, o estudo proporcionará diagnóstico da deficiência de biotinidase permanente ou erro inato do metabolismo aos Rns que participarem do estudo, além de contribuir para um melhor manejo terapêutico dos mesmos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo reveste-se de importância científica e apresenta metodologia que permite alcançar os objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados.

Recomendações:

Os autores devem apresentar relatório das atividades da pesquisa, informando as possíveis mudanças na metodologia durante o desenvolvimento do projeto.

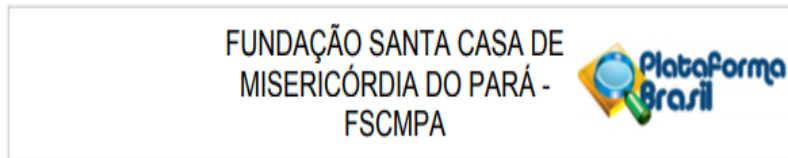
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra critérios éticos para o seu desenvolvimento, considerado como Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:



Continuação do Parecer: 1.762.323

Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.pdf	08/06/2016 12:20:18	Carla Leonor Melo Vinagre Machado	Aceito
----------	---------------------------	------------------------	--------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

BELEM, 05 de Outubro de 2016

Assinado por:
LIENE DO SOCORRO CAMARA XIMENES
(Coordenador)

