

# Deficiencia de la actividad de biotinidasa en la población de recién nacidos del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá

Susana Der Parsehian<sup>a\*</sup>; María I. Otegui<sup>b\*\*</sup>; Gustavo Dratler<sup>c\*\*</sup>; Susana I. Garcia<sup>d\*</sup>; Alejandra Ribas<sup>e\*\*</sup>; Graciela Areny<sup>f\*\*</sup> y Luisa Bay<sup>g\*\*</sup>

## Resumen

La deficiencia de biotinidasa es una enfermedad autosómica recesiva del metabolismo provocado por la ausencia o deficiencia de esta enzima.

Clínicamente se caracteriza por síntomas neurológicos: convulsiones, ataxia, pérdida de la audición, atrofia óptica, retardo del desarrollo, alopecia, problemas dermatológicos y alteraciones metabólicas (acidemia orgánica cuya descompensación puede llevar al coma o a la muerte). La importancia de tener un método cuantitativo en suero o plasma es importante para confirmar esta patología.

**Objetivo:** Obtener valores de referencia de actividad de biotinidasa en la población de recién nacidos (RN) en una maternidad pública aplicando un método colorimétrico para la cuantificación de la enzima en suero.

**Material y métodos:** Se obtuvieron muestras de pesquisa neonatal y sueros de una población de 238 RN. La actividad de la biotinidasa fue determinada utilizando un método colorimétrico (a partir de una modificación del kit Umtest Biotinidasa de Tecnosuma). Los valores de referencia obtenidos en nuestra población fueron compatibles con los hallados en la bibliografía. La población patológica

testigo presentó valores concordantes con su clasificación diagnóstica.

**Palabras clave:** biotinidasa, metabopatías, pesquisa metabólica, déficit congénito de biotinidasa.

## Abstract

Biotinidase's Deficiency is an autosomal recessive disorder of metabolism caused by the absence or deficiency of the enzyme. The clinical setting characterizes for neurological (convulsions, ataxia, auditive loss, optic atrophy, development delay), alopecia, skin rash and metabolic alterations (organic acidemia whose decompensation can produce coma or death). The availability of a quantitative technique in blood serum is vital to confirm this pathology.

**Objective:** To obtain reference values for a population of newborns at Public Maternity applying a colorimetric quantitative method in serum blood.

**Material and methods:** Dried blood samples and sera were obtained from a population of 238 newborns. The activity of Biotinidase was measured by using a colorimetric method (from a modification of the Umtest Bionitidase kit of Tecnosuma.) We obtained reference values in the analysed population, which are compatible with the bibliographic values used until now. The control pathological population had results according to its diagnostic classification.

**Key words:** biotinidase, metabolic alterations, metabolic screening, congenital deficit of biotinidase.

## Introducción

La Biotina es una vitamina del complejo B que actúa en procesos metabólicos claves como gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y el catabolismo de aminoácidos.<sup>1</sup> El Déficit de Biotinidasa es un error innato del metabolismo caracterizado por una alteración de la Biotinidasa, enzima responsable del reciclado de la Biotina a partir de los complejos biotina-lisina (Biocitina). El cuadro clínico de

- a. Bioquímica.
- b. Bioquímica.
- c. Bioquímico.
- d. Médica.
- e. Bioquímica.
- f. Bioquímica.
- g. Médica.

\* Hospital Materno Infantil Ramón Sardá.

\*\*Hospital de Niños Prof. Dr. Juan P. Garrahan.

Dirección postal: Esteban de Luca 2151

Dirección electrónica: parsegh@gmail.com

la enfermedad se caracteriza por daños neurológicos (incluyendo convulsiones mioclónicas, hipotonía, ataxia, pérdida auditiva, atrofia óptica, anormalidades en el desarrollo) y dermatológicos (dermatitis seborreica o atópica, alopecia parcial o total y conjuntivitis), también acidemia orgánica con descompensación metabólica aguda que puede llevar al coma, e incluso la muerte.<sup>2</sup>

La deficiencia total de biotinidasa es el objetivo primario de la pesquisa neonatal, pero aunque consideradas de menor gravedad se ha demostrado la necesidad de detectar y tratar también las formas parciales de la enfermedad.

El método utilizado en el Programa de Pesquisa de la Ciudad de Buenos Aires (PPN) es una metodología cualitativa (BioRad) basada en el método de Knappe.<sup>3</sup> Se mide la actividad de la enzima Biotinidasa presente en sangre seca impregnada en papel de filtro (tipo Whatman 903) midiendo la acción hidrolítica de la enzima presente en el material sanguíneo. El laboratorio de pesquisa y el de metabolopatías del Hospital Garrahan han implementado una metodología confirmatoria consistente en determinar cuantitativamente la actividad de la biotinidasa en muestras de suero o plasma (heparinizado), basados en la adaptación de un kit diagnóstico utilizado en la pesquisa neonatal.<sup>4</sup>

## Metabolismo de la biotina y deficiencia de biotinidasa

La biotina, reconocida como tal desde el año 1936,<sup>2</sup> es absorbida sin ser transformada, en el intestino delgado y es distribuida a todos los tejidos del organismo. Se puede encontrar en altas concentraciones en el hígado y los riñones y se conoce muy poco sobre su transporte y almacenamiento.

Aunque la biotinidasa se conocía desde mediados de siglo, no es hasta la década del 80 que Wolf y cols., muestran que su deficiencia es el defecto bioquímico primario en pacientes con la forma de presentación tardía o juvenil de la deficiencia múltiple de carboxilasas.<sup>5</sup>

La biotinidasa presenta una actividad enzimática elevada en suero, hígado, riñón, glándula suprarrenal y baja actividad en cerebro.<sup>6-8</sup> Además, la enzima está presente en las células secretoras, las que incluyen a los fibroblastos, los leucocitos y el jugo pancreático.<sup>9,10</sup> También se ha detectado su presencia en la orina humana.<sup>11</sup> De todas estas fuentes, el suero es la que exhibe la mayor actividad específica; por ello ha sido la más estudiada y empleada en protocolos de purificación.<sup>12,13</sup>

La biotinidasa de suero humano es un polipéptido glicosilado de simple cadena con un peso molecular reportado entre 66 y 76 kDa.<sup>12-14</sup>

La deficiencia de biotinidasa es una anomalía metabólica con un patrón de herencia autosómico recesivo. Estimados internacionales plantean que 1 de cada 123 individuos es portador del gen para la deficiencia.<sup>15,16</sup>

Se han descrito más de 30 mutaciones que provocan deficiencia de biotinidasa, de ellas las más comunes en pacientes con la deficiencia total son la mutación G98d7i3, una delección/inserción en la secuencia guía que resulta en un cambio en el marco de lectura y la terminación temprana en la síntesis de la enzima y la mutación R538C que provoca la sustitución de Arg538 por una Cys en el exón D del gen. Se ha reportado que la principal causa de deficiencia parcial es la mutación D444H en un alelo del gen asociado con la presencia de una mutación para deficiencia total en el otro alelo.<sup>17-19</sup>

## Objetivo general

Es establecer valores de referencia de actividad de biotinidasa en la población de recién nacidos en un hospital materno-infantil de la CABA mediante una metodología cuantitativa en suero o plasma.

## Objetivo secundario

- Tener diagnóstico de certeza del déficit totales de biotinidasa, confirmando el diagnóstico presuntivo inicial;
- obtener diagnósticos de las formas de déficit parcial de biotinidasa, los cuales podrían perderse de sostener la pesquisa únicamente con la determinación cualitativa;
- beneficiar a la población neonatal de la Maternidad Ramón Sardá con una prestación diagnóstica altamente sensible para dilucidar casos sospechosos de este error innato del metabolismo.

## Métodos

La población estudiada incluyó 238 recién nacidos (Edad días: 1-33. Edad Gestacional [EG]: 35-42 semanas) en interacción conjunta con la madre a los que se les debía realizar la pesquisa metabólica antes del alta médica.

**Muestreo:** no probabilístico de forma consecutiva. Estudio descriptivo, observacional.

A la madre se la invitó a participar del estudio, el cual fue presentado y discutido con ella y se le entregó previa lectura y firma el Formulario de Consentimiento de Participación

Una vez extraídas las muestras, las mismas fueron centrifugadas, separadas del coágulo en forma inmediata, fraccionadas y conservadas a -20°C hasta su resolución.

Como la biotinidasa es una enzima naturalmente lábil, y su actividad decae rápidamente en el transcurso de pocos días, las muestras fueron inmediatamente remitidas al laboratorio de pesquisa del Hospital Garrahan para su procesamiento o conservación.

Como grupo control patológico se incluyeron 10 recién nacidos que presentaron resultados de pesquisa neonatal reiteradamente alterados (formas parciales y heterocigotas) y 2 recién nacidos con diagnóstico de deficiencia total de Bio-

tinidasa. Respecto de los dos niños clasificados como déficit total de biotinidasa.

Uno de ellos fue detectado por pesquisa neonatal, y el diagnóstico fue confirmado bioquímicamente mediante el dosaje de la actividad de la enzima en suero.

El segundo paciente se trató de un niño recién nacido de término y con peso adecuado a su edad gestacional (RNT/PAEG) al cual no se le había efectuado la pesquisa neonatal de Biotinidasa. El niño presentaba convulsiones atípicas (episodios convulsivos clónicos generalizados y nistagmos de 1 a 2 min de duración, varios por día). Requirió internación a los 3 meses, presentando policultivos negativos, TAC cerebral normal, y EEG normal. Fue medicado con fenobarbital y dado de alta.

A los dos meses repitió episodio tónico clónico generalizado, con desvío de mirada, por lo que se interna con complicación de cuadro respiratorio por VSR(+) requiriendo asistencia respiratoria mecánica (ARM) sin inotrópicos. Sus pupilas estaban isocóricas y reactivas. Presentaba lesiones hipocrómicas en piel de tronco y alopecia parcial en la región occipital. Cursaba un broncoespasmo moderado. Se encontraba medicado con fenobarbital, lorazepam y piridoxina y difenilhidantoina (20 mg/kg/dosis).

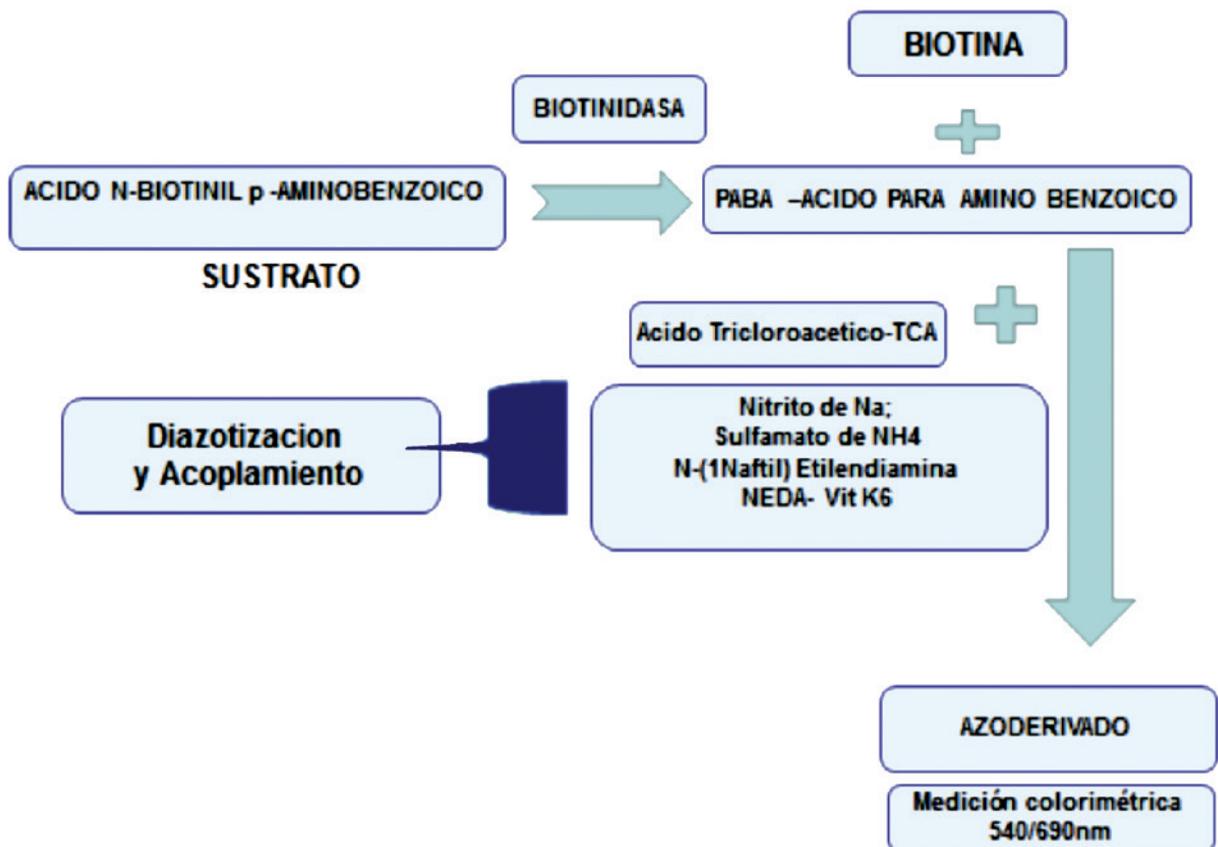
Una evaluación posterior realizada por Neurología dio EEG patológico. Los estudios de líquido cefalorraquídeo tanto el estudio citoquímico como los cultivos fueron normales. El análisis del medio interno se encontraba dentro de los límites considerados normales, así como los valores del ácido láctico, amonio, glucemia y CPK. El niño no presentó acidosis. Se realizó una pesquisa ampliada que sugería déficit de biotinidasa, la cual se confirmó con la valoración cuantitativa de la enzima por lo que el diagnóstico final fue de déficit total de biotinidasa.

Se inició el tratamiento con biotina 50 mg/día, desapareciendo las crisis a las 48 hs por lo que se suspendió la piridoxina y la difenilhidantoina.

### Procedimiento

La medición de la enzima se realiza mediante la hidrólisis de ésta enzima a partir del sustrato biotinil-ácido-p-amino benzoico (Biotinil-PABA), en condiciones apropiadas de pH y temperatura, el cual produce ácido para-amino benzoico (PABA). El mismo, en un medio ácido y en presencia de Nitrito de Sodio, Sulfamato de Amonio y Vitamina K6 conduce a la formación de un complejo de color púrpura que es leído a una absorbancia de 546 nm.<sup>4</sup>

#### Mecanismo bioquímico de la determinación de Biotinidasa



Se emplean 475 µl del Biotinil-Ácido p-amino benzoico (Biotinil-PABA) 0,15 mM como sustrato, y se agregan 25 µl de suero o plasma heparinizado. Se incuba durante una hora a 37°C. La reacción es detenida por el agregado de ácido tricloroacético (TCA) 30%. Se centrifuga durante 15 min a 10.000 rpm y se extraen 200 µl del sobrenadante y se lo dispensa en una placa de microtitulación transparente de fondo plano.

Se utiliza una curva de calibración de Ácido p-amino benzoico correspondiente a las distintas actividades (0, 1, 2, 4, 8 y 12 nmoles/min/ml). En su preparación se ajustan las correspondientes proporciones utilizando una solución reguladora de Fosfato de Potasio 47 mM, EDTA 4.5 mM, pH 6.0 y la solución stock de PABA.<sup>4</sup>

Se toman 200 ul de las soluciones de calibración y se procesan de igual forma que los 200 ul del sobrenadante de las muestras.

Para el desarrollo de color se adicionan en orden consecutivo y en intervalos de 3 minutos los siguientes reactivos: Nitrito de Sodio (0,1 N: 20µl), Sulfamato de Amonio (0,5% P/V: 20µl) y N-(1-Naftil) Etilendiamina Diclorhidrato - Vitamina K6 - (0,1% P/V: 20µl). Se homogeneiza y se incuba durante 10 minutos en cámara húmeda. El compuesto coloreado (púrpura) resultante, es leído a 546 nm.

### Resumiendo

1. Sustrato (Biotinil-PABA) 0,15 mM 475 µl + 25 µl suero.
2. Incubación 1 hora 37 C.
3. Detener reacción con TCA 30%.
4. Reposo 5 min.
5. Centrifugar 15 min 10000 rpm.
6. Transferir 200 ul de sobrenadante a placa de microtitulación.
7. Agregar NO<sub>2</sub>Na. 0,1 N: 20µl.
8. Agregar Sulfamato de NH<sub>4</sub>: 0,5% P/V: 20µl.
9. Agregar Vit. K6: 0,1% P/V: 20µl.
10. Incubar 10 min. y leer absorbancia 546 nm.

Los valores de absorbancia de las muestras de actividad de biotinidasa desconocida se interpolan en un gráfico de absorbancia vs actividad biotinidasa obteniéndose los resultados en nmol/min/ml.

Las muestras se interpretan en la curva de calibración obteniéndose un resultado cuantitativo, preciso y sensible de la actividad de Biotinidasa, resultando un método diagnóstico y confirmatorio para Déficit de Biotinidasa.

De este modo se consiguió clasificar las muestras estudiadas en cada ensayo en tres categorías: Normal, Déficit Parcial y Déficit Total de Biotinidasa.

## Resultados

La clasificación de las muestras se realizó de acuerdo a la bibliografía (20) según:

- Heterocigotos: 30-50% de la actividad enzimática promedio (2,2 a 5,0 nmol/min/mL).
- Déficit parcial: 10-30% de actividad enzimática promedio (0,7 a 2,1 nmol/min/mL).
- Deficiencia de Biotinidasa: <10% de actividad enzimática promedio (<0,7 nmol/min/mL).

La población de 238 recién nacidos presentó una actividad de Biotinidasa (Media ± SD) 7,75 ± 1,77 nmoles/min/ml). Los valores de referencia obtenidos para la población normal surgirían de su expresión percentilada (p95%-p5%) según *Tabla 1*.

**Tabla 1. Valores de actividad de biotinidasa normal, heterocigotos, déficit parcial y déficit total ((nmol/min/mL) en la población de neonatos del HMI Ramón Sarda (Año 2009-2010)**

	p95%	p5%	p50%
Normales (n: 238)	11,47	5,09	7,45

La población de recién nacidos con valores alterados de actividad de Biotinidasa resultó según *Tabla 2*. Esta población de control presentó resultados concordantes con su clasificación diagnóstica.

**Tabla 2**

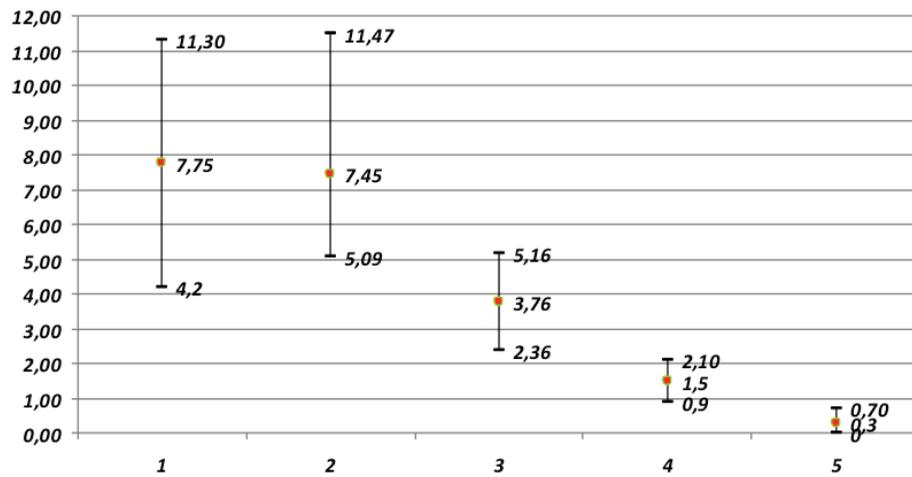
	p95%	p5%	p50%
Heterocigotos (n: 8)	5,16	2,36	3,76
Déficit parcial (n: 2)	2,10	0,9	1,5
Déficit total (n: 2)	0,70	0	0,3

Los parámetros del ensayo fueron CV% intraensayo: 2,2-6,0%. CV% interensayo: 3,5-12,3%. Concentración Mínima detectable: 0,01.

## Discusión

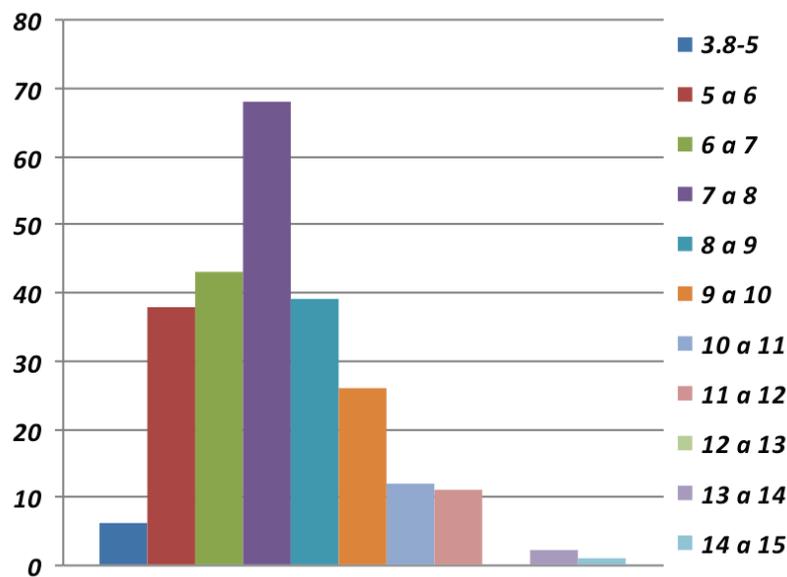
El programa de pesquisa de la Ciudad de Buenos Aires realiza un test cualitativo para ensayar actividad de biotinidasa. Ante la presencia de un resultado alterado (Déficit parcial o total de biotinidasa) debe reconfirmarse con el mismo test cualitativo en una segunda muestra a fin de asegurar que la actividad disminuida detectada sea real y no producto de un deterioro de la muestra o consecuencia de una muestra escasa.

Figura 1. Distribución de la actividad de la biotinidasa en suero de la población neonatal (n: 238). Expresada como nmol/min/ml



## Distribución de Valores Normales

Figura 2: Actividad biotinidasa expresada como nmol/min/ml



Resultados persistentemente alterados con esta técnica cualitativa deben asumirse como presuntos positivos y luego de la consulta con el especialista en enfermedades metabólicas, se realiza la confirmación diagnóstica por dosaje cuantitativo de actividad de Biotinidasa en suero. Esta metodología no estaba disponible en el ámbito del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires, y las muestras debían derivarse al sector privado a un costo monetario elevado, por lo que su implementación a partir de principios del año 2010 benefició no solo a la población de recién nacidos del Hospital Materno

Infantil Ramón Sarda sino también al Programa de Pesquisa Neonatal (PPN) del Ministerio de Salud de la Ciudad de Buenos Aires.

## Referencias

1. Wolf B, et al. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. Clin Chim Acta 1983; 131:273-81.
2. Nyhan WL: Inborn Errors of Biotin metabolism: Arch Dermatol 1987; 123:1696-8.

3. Instruction Manual Quantase Neonatal Biotinidase Deficiency Screening Bio-Rad Laboratories California USA. 2003. Págs.1-13.
4. González E, Díaz L, Fromela A, et al. Quantitative assay to determine the hydrolytic activity of biotinidase. *Biomedica* 2001; 21:360-8.
5. Wolf B, Grier RE, Parker WD, Goodman SI, Allen RJ. Deficient biotinidase activity in late-onset multiple carboxylase deficiency. *N Engl J Med* 1983; 308:161.
6. Píspa J. Animal biotinidase. *Ann Med Exp Biol Fenn* 1965; 43(Suppl 5):1-39.
7. Nilsson L, Kagedal B. Lipoamidase and biotinidase activities in the rat: tissue distribution and intracellular localization. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32 (7):501-9.
8. Suchy SF, McVoy JR, Wolf B. Neurologic symptoms of biotinidase deficiency: possible explanation. *Neurology* 1985; 35(10):1510-11.
9. Wolf B, Heard GS, McVoy JS, Raetz HM. Biotinidase deficiency: the possible role of biotinidase in the processing of dietary protein bound biotin. *J Inher Metab Dis* 1984; 7(2):121-22.
10. Heard GS, Grier RE, Weiner DL, McVoy JR, Wolf B. Biotinidase deficiency. *Ann NY Acad Sci* 1985; 447:252-62.
11. De Felice C, Hayakawa K, Tanaka T, Terentieva E. Biotinidase activity in the urine of healthy subjects. *Nephron* 1995; 70(1):115.
12. Craft DV, Goss NH, Chandramouli N, Wood HG. Purification of biotinidase from human plasma and its activity on biotinyl peptides. *Biochemistry* 1985; 24 (10):2471-76.
13. Chauhan J, Dakshinamurti K. Purification and characterization of human serum biotinidase. *J Biol Chem* 1986; 261(9):4268-75.
14. Wolf B, Miller JB, Hymes J, JS McVoy, Ishikawa Y, Shapira E. Immunological comparison of biotinidase in serum from normal and biotinidase deficient individuals. *Clin Chim Acta* 1987; 164(1):27-32.
15. Wolf B, Heard GS. Disorders of biotin metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 6th Ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 1989. Págs. 2083-103.
16. Wolf B, Heard GS. Biotinidase Deficiency. *Adv Pediatr* 1991; 38:1-21.
17. Wolf B, Pomponio RJ, Norrgard KJ, Lott IT, Baumgartner ER, Suormala T, et al. Delayed-onset profound biotinidase deficiency. *J Pediatr* 1998; 132(2):362-65.
18. Wolf B, Norrgard K, Pomponio RJ, Mock DM, McVoy JR, Fleischauer K, et al. Profound biotinidase deficiency in two asymptomatic adults. *Am J Med Genet* 1997; 73(1):5-9.
19. Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL, Parker WD, et al. Phenotypic variation in biotinidase deficiency. *J Pediatr* 1983; 103(2):233-37.
20. Hommes, editor. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics*. New York: Willey-Liss 1991.