

AVALIAÇÃO DE ESTRUTURAS DE VARIANTES DE BIOTINIDASE

Paula Hochsteiner de Macedo, Alaide Cristina de Bem Matos, Joana Ribeiro Colombo Barbisan, Maria de Lourdes Borba Magalhães.

INTRODUÇÃO

A biotina é uma vitamina essencial que, na dieta, encontra-se ligada a proteínas e precisa ser liberada na forma livre pela ação da enzima biotinidase para atuar como cofator em vias metabólicas vitais. Mutações no gene da biotinidase, amplamente descritas em humanos, comprometem sua atividade e resultam em manifestações neurológicas e cutâneas graves. Embora em animais domésticos os relatos de mutações sejam raros e pouco estudados, a deficiência de biotina — seja genética ou adquirida — pode ter impacto significativo na saúde, tornando esse tema relevante também na medicina veterinária. O presente estudo teve como objetivo **desenvolver e otimizar um ensaio de atividade da biotinidase**, criando uma ferramenta para avaliar como diferentes mutações podem interferir na função enzimática. Os resultados reforçam a importância do estudo da biotinidase não apenas no contexto humano, mas também como base para futuras investigações em animais, contribuindo para o avanço do diagnóstico, manejo clínico e prevenção de manifestações associadas à sua deficiência.

DESENVOLVIMENTO

A atividade da biotinidase (BTD) foi avaliada por meio de ensaios cinéticos *in vitro*, utilizando biotina-PABA como substrato sintético em amostras de soro humano. O protocolo adotado foi o modificado de Destanoglu (2023), no qual a biotinidase cliva o substrato liberando ácido p-aminobenzóico (PABA). Esse produto foi quantificado por método colorimétrico em espectrofotometria baseado na reação de Griess, em que o PABA livre forma uma coloração rosa/roxa, e foi mensurado a 546 nm. As reações foram conduzidas em misturas contendo tampão fosfato (pH 6,0), albumina humana (3,95 mM), incubadas a 37 °C por 3 minutos. Posteriormente, foram interrompidas com ácido tricloroacético (30%), centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante utilizado para a quantificação colorimétrica. Para a análise cinética, foram testadas cinco concentrações de biotina-PABA (0,1–1,0 mM) permitindo a construção da curva padrão de atividade da BTD e o cálculo dos parâmetros K_m e V_{max} . Todas as análises foram conduzidas em triplicata para garantir confiabilidade. Os dados de velocidade inicial foram plotados no software SigmaPlot 14.5.

RESULTADOS

Por meio dos ensaios cinéticos foi possível quantificar a atividade da biotinidase em soro humano e determinar parâmetros enzimáticos fundamentais, como K_m e V_{max} . A análise do gráfico de Michaelis-Menten demonstrou que a velocidade da reação aumenta de forma hiperbólica à medida que a concentração de substrato se eleva, até atingir uma velocidade máxima (V_{max}). Esses resultados indicam que a biotinidase apresenta comportamento típico de uma enzima michaeliana, com valores de V_{max} de **3.88×10^3 mM/min** e K_m de **1.82×10^{-1} mM**.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu o desenvolvimento e a otimização de um ensaio confiável para a avaliação da atividade da biotinidase em soro humano. A determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) confirmou que a enzima apresenta comportamento michaeliano, fornecendo informações fundamentais sobre sua dinâmica catalítica. Com essa ferramenta, será possível **investigar de forma sistemática se mutações no gene da biotinidase resultam em perda de atividade enzimática**, contribuindo para a compreensão das consequências funcionais dessas alterações. Além disso, os resultados reforçam a relevância do tema para a medicina humana e veterinária, oferecendo bases para aprimorar o diagnóstico, o manejo clínico e a prevenção de distúrbios associados à deficiência de biotinidase.

Palavras-chave: Biotinidase; Cinética enzimática; K_m ; V_{max} ; Deficiência de biotinidase.

ILUSTRAÇÕES

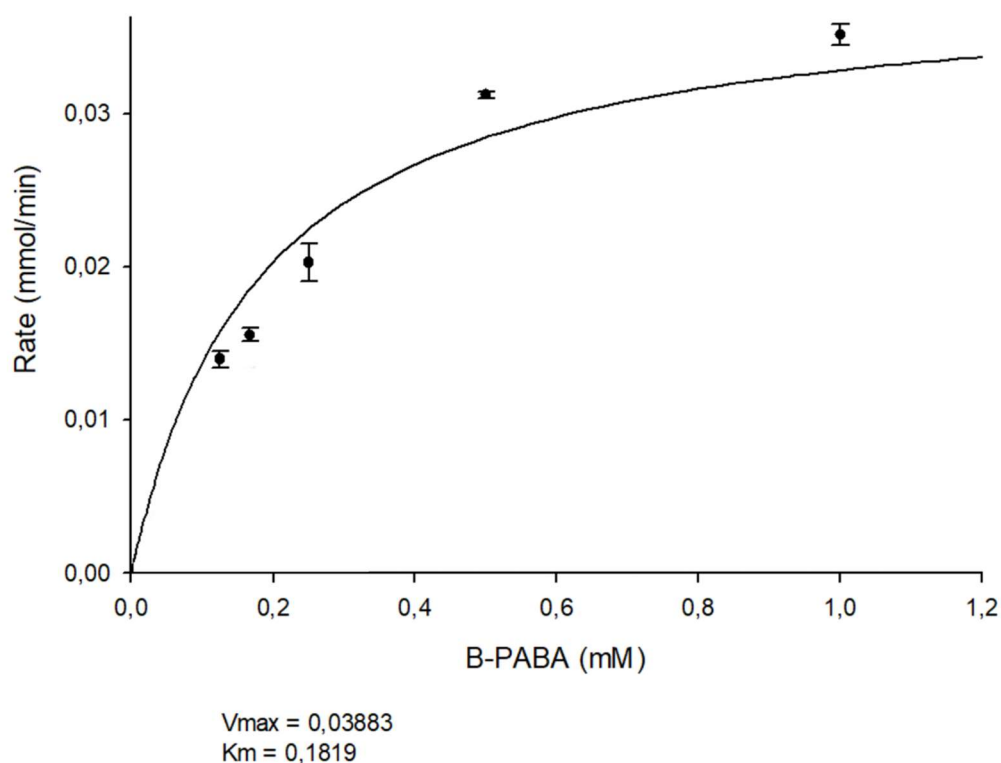


Figura 1. Curva de Michaelis-Menten representando a atividade da biotinidase em soro humano utilizando B-PABA como substrato. Observa-se aumento hiperbólico da velocidade da reação (Rate, mmol/min) em função da concentração de substrato (mM), até alcançar a velocidade máxima (V_{max} = 0,03883 mmol/min). O valor de K_m obtido foi de 0,182 mM, caracterizando comportamento típico de enzima michaeliana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANDA, Ebru. **Biotinidase deficiency: prevalence, impact and management strategies.** *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics*, v. 11, p. 127-133, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/PHMT.S198656>.

DESTANOGLU, O., Cansever, M. Ş., İşat, E., Zübarioğlu, T., Zeybek, A. Ç. A., & Kiyıkım, E. (2023). **Análise da atividade da biotinidase no soro por detecção de colorimetria por imagem digital.** *ACS Omega*, 8(42), 39796-39806. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c05759>

HYMES. J; Wolf, B. **Biotinidase and its roles in biotin metabolism.** *Clin Chim Acta*, 1996.

SCHULPIS, K.H. et al. (2003). The effect of neonatal jaundice on biotinidase activity. *Early Hum. Dev.*, 72, 15–24.

ZEMPLANI, J., Hassan, Y.I. & Wijeratne, S.S. (2008). Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev. Endocrinol. Metab*

DADOS CADASTRAIS

BOLSISTA: Paula Hochsteiner de Macedo

MODALIDADE DE BOLSA: PROBIC/UEDESC

VIGÊNCIA: 01/09/2024 a 31/08/2025 Total: 12 meses

ORIENTADOR(A): Maria de Lourdes Borba Magalhães

CENTRO DE ENSINO: CAV

DEPARTAMENTO: Produção Animal e Alimentos

ÁREAS DE CONHECIMENTO: Ciências Biológicas / Bioquímica

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: Deficiência da biotinidase causada pelo aumento dos níveis de bilirrubina associada ao desenvolvimento de encefalopatia hepática.

Nº PROTOCOLO DO PROJETO DE PESQUISA: PVAV86-2024

