

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO 3'UTR E DE ELEMENTOS
REGULATÓRIOS DO GENE *BTD*
EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE ATIVIDADE DA
BIOTINIDASE**

Gerda Cristal Villalba Silva

Orientadora: Profa. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz
Coorientadora: Dra. Fernanda Sperb-Ludwig

Porto Alegre
Agosto de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO 3'UTR E DE ELEMENTOS
REGULATÓRIOS DO GENE *BTD* EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES
NÍVEIS DE ATIVIDADE DA BIOTINIDASE**

Gerda Cristal Villalba Silva

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito parcial para
obtenção do grau de **Mestre em Genética e
Biologia Molecular**

Orientadora: Profa. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Coorientadora: Dra. Fernanda Sperb-Ludwig

Porto Alegre

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCEIRAS

Este trabalho foi realizado no Laboratório BRAIN (*Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences*) localizado no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com colaboração da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) situado no HCPA.

O apoio financeiro ao projeto, cujo número de registro 16-0480, foi concedido pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

A vida nos proporciona bons momentos de aprendizagem, lembranças e situações boas e algumas nem tanto, mas é preciso lembrar-se de todos os bons frutos que colhemos na nossa caminhada. Agradeço primeiramente aos meus pais por minha existência e a minha família pelo apoio e por proporcionar subsídios para minha estadia em Porto Alegre. Citando uma passagem de uma das minhas sagas favoritas, “Grandes líderes inspiram a grandeza em outras pessoas.” Sendo assim, agradeço também à minha orientadora, profa. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz e a minha coorientadora Dra. Fernanda Sperb-Ludwig pela oportunidade de estar no melhor programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Brasil; e por serem meus exemplos de mulheres dentro da Ciência.

Agradeço também aos colegas do laboratório BRAIN; aos colegas do BioCore pelo companheirismo e por todos os momentos de aprendizagem no Núcleo de Bioinformática e a todos os demais amigos (as) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de clínicas de Porto Alegre. Ao Everaldo, que zela pelo nosso Centro de Pesquisa Experimental. Ao Departamento de Genética, pela experiência de ser Representante Discente do nosso PPGBM que completa 55 anos de excelência em ensino e pesquisa. À equipe da secretaria do nosso PPGBM, em especial ao querido Elmo, por todo o empenho e dedicação pelo nosso programa, exemplo de competência que todos devem seguir!

Aos pacientes com deficiência de biotinidase, e aos seus entes queridos, por participarem da pesquisa. Sem vocês nada aconteceria!

Aos amigos da capital, e aos amigos da minha cidade, mesmo estando longe sempre me deram forças para continuar a caminhar (e a acreditar em mim mesma). Em toda a minha vida eu guardo gratidão por todos aqueles que compartilharam momentos comigo, há sempre o que aprender em todos eles.

Agradeço enfim à Vida, ao Universo e tudo mais!

“Lembre-se: seu foco determina a sua realidade.”

(Star Wars, A ameaça Fantasma).

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	10
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	10
1.2 Biotina, Ciclo da Biotina e Deficiência de Biotinidase	13
1.3 Métodos de diagnóstico	16
1.4 Explorando as regiões não codificantes: o admirável mundo da região 3'UTR	19
1.5 Desbravando o Universo dos miRNAs	23
2. JUSTIFICATIVA	29
3.HIPÓTESES	30
4. OBJETIVOS	31
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO GERAL	58
7. CONCLUSÕES	62
8. PERSPECTIVAS	63
9.REFERÊNCIAS	64
9. ANEXOS	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABraOM: Arquivo Brasileiro Online de Mutações

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BPABA: N-biotinil-p-aminobenzoato

BTD: Biotinidase

DB: Deficiência de Biotinidase

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPaB: Deficiência Parcial de Biotinidase

DTB: Deficiência Total de Biotinidase

ECR: Regiões Evolutivamente Conservadas

ExAC: Exome Aggregation Consortium

MFE: Energia Livre de Ligação (*Minimum Free Energy*)

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NV: Nascidos Vivos

PNTN: Programa Nacional de Triagem Neonatal

RISC: Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

RNA: Ácido Ribonucleico

lncRNA: RNA longo não codificante

mRNA: RNA mensageiro

miRNA: Micro RNA

ncRNAs: RNAs não codificantes

UTR: Região não traduzida (*Untranslated Region*)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Erros inatos do metabolismo classificados no grupo 1.....	12
Figura 2: Principais fontes de biotina da nossa dieta	13
Figura 3: O ciclo da biotina.....	14
Figura 4: Organização do gene que codifica a biotinidase (<i>BTD</i>), seu mRNA e peptídeo resultante.....	18
Figura 5: Resumo das alterações em elementos regulatórios presentes na região 3'UTR do mRNA em doenças humanas.....	21
Figura 6: Distribuição dos miRNAs em diferentes genomas.....	24
Figura 7: Etapas da biossíntese de miRNAs.....	26
Tabela 1: Resumos da estimativa mundial e nacionais de deficiência de biotinidase.....	15
Tabela 2: Bases moleculares da deficiência de biotinidase	19

RESUMO

Introdução: A atividade reduzida da biotinidase associa-se a um espectro de deficiência que varia desde a deficiência total até níveis compatíveis com heterozigose, não havendo uma perfeita associação com a presença de mutações patogênicas no gene *BTD*. Regiões 3'UTR são sítio de ação de reguladores pós-transcricionais que influenciam na expressão gênica, entre eles os microRNAs (miRNAs). A investigação de miRNAs com alvos em *BTD* e de outros elementos regulatórios, assim como a caracterização de variantes na região 3'UTR, pode apresentar relevância na compreensão da relação genótipo-fenótipo. **Objetivos:** 1) Caracterizar os elementos regulatórios da região 3'UTR do gene *BTD*; 2) identificar variantes em pacientes com atividade reduzida de biotinidase que possam explicar as discrepâncias observadas entre genótipo e fenótipo bioquímico. **Metodologia:** Foram avaliados 92 pacientes com atividade reduzida da biotinidase (nível de heterozigoto=33, borderline (Parcial/Hz e Hz/N)= 35, parcial=20 ou total=4). A discrepância entre o genótipo e o fenótipo bioquímico esperado/encontrado ocorreu em 32/92 pacientes (34,7%). A região 3'UTR do gene *BTD* foi amplificada por PCR e sequenciada pelo método de Sanger. Foram realizadas análises *in silico* para identificar miRNAs associados ao gene *BTD*, as análises da estrutura secundária foram realizadas com o pacote RNAfold. Sinais de poliadenilação foram indentificados pelo banco APASdb e o algoritmo Polya_svm, e elementos ricos em AU pelo RegRNA e ARE SITE. **Resultados:** Todas as sequências analisadas apresentaram 100% de homologia com a sequência de referência. Foram encontrados possíveis miRNAs associados ao gene *BTD* e aos genes que participam do metabolismo da biotina. Além disso, foram encontrados 6 elementos ricos em AU associados à região 3'UTR de *BTD*, possivelmente envolvidos no decaimento do mRNA, regulação da instabilidade e resposta ao stress celular. **Conclusão:** 1) Até o momento, não existem interações fortemente validadas entre miRNAs e o gene *BTD*, o que deixa como perspectiva futura sua validação experimental. 2) Este estudo permitiu concluir que variantes na região 3'UTR do gene *BTD* que codifica a enzima biotinidase não explicam as discrepâncias encontradas entre o genótipo e o fenótipo bioquímico dos pacientes com atividade reduzida da biotinidase.

Palavras-chaves: 3'UTR, microRNAs, elementos ricos em AU, biotinidase.

ABSTRACT

Introduction: The reduced activity of biotinidase is associated with a spectrum that varies from total deficiency to heterozygous compatible levels, and there is no perfect association between the presence of pathogenic mutations in the *BTB* gene. 3'UTR regions are the site of action of post-transcriptional regulators that influence gene expression, including microRNAs (miRNAs). The investigation of miRNAs with targets in *BTB* and other regulatory elements, as well as the characterization of variants in the 3'UTR region, may show relevance in the understanding of the genotype-phenotype relationship. **Objectives:** 1) To characterize the regulatory elements of the 3'UTR region of the *BTB* gene; 2) To identify variants in patients with reduced biotinidase activity that may explain the discrepancies observed between genotype and biochemical phenotype. **Methodology:** We evaluate 92 patients with reduced biotinidase activity (heterozygote level = 33, borderline (Partial / Hz and Hz / N) = 35, partial = 20 or total = 4). The discrepancy between the genotype and the expected/found biochemical phenotype occurred in 32/92 patients (34.7%). We amplified the 3'UTR region with PCR and sequenced by the Sanger method. *In silico* analyzes have been performed to identify miRNAs associated with the *BTB* gene, analyzes of the secondary structure performed with the RNAfold package. We identified polyadenylation signals by the APASdb bank and the PolyA_svm algorithm, and AU rich elements by RegRNA and ARE SITE. **Results:** All sequences show 100% homology to the reference sequence. We found possible miRNAs associated with the *BTB* gene and the genes involved in biotin metabolism. Also, 6 AU-rich elements associated with the 3'UTR region of *BTB* were found, possibly involved in mRNA decay, regulation of instability and response to cellular stress. **Conclusion:** 1) There are no strongly validated interactions between miRNAs and the *BTB* gene, which leaves its experimental validation from a future perspective. 2) This study allows to conclude that variants in the 3'UTR region of the *BTB* gene, that encodes the biotinidase enzyme, do not explain the discrepancies found between the genotype and the biochemical phenotype of patients with reduced biotinidase activity.

Keywords: 3'UTR, microRNAs, AU rich elements, biotinidase.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os Erros Inatos do Metabolismo constituem um grupo de cerca de 750 doenças genéticas que podem afetar a síntese, degradação, processamento e transporte de moléculas no organismo. Individualmente são doenças raras, que reunidas apresentam uma prevalência estimada de 1:800 indivíduos. Em sua maioria, os erros inatos do metabolismo possuem padrão de herança autossômico recessivo (Martins, 1999; Saudubray & García-Cazorla, 2018). Os primeiros estudos e a alcinha do termo Erro Inato do Metabolismo são méritos do pesquisador Archibald Garrod, que estudou os aspectos bioquímicos e genéticos da alcaptonúria (Garrod, 1902).

A classificação mais conhecida desses distúrbios metabólicos parte dos postulados de Saudubray e Charpentier (1995), resumidos a seguir:

Categoria 1: Aqueles que envolvem alterações que afetam um único sistema orgânico ou apenas um órgão, como o sistema imunológico e os fatores de coagulação ou túbulos renais e eritrócitos.

Categoria 2: Grupo de doenças cujo defeito bioquímico compromete uma via metabólica comum a diversos órgãos, como as doenças lisossomais, ou restrito a um órgão apenas, porém com manifestações humorais e sistêmicas, como a hiperamonemia nos defeitos do ciclo da ureia.

A grande variabilidade das doenças que compõem a categoria 2 permitem-nos agrupá-las em mais um nível de classificação, condizentes com suas características fisiopatológicas e fenótipo clínico:

Grupo 1: Distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas;

Grupo 2: Erros inatos do metabolismo intermediário que culminam em intoxicação aguda ou crônica;

Grupo 3: Deficiência no metabolismo energético.

As doenças que se enquadram no primeiro grupo apresentam sintomas que tendem a acentuar com o tempo, como dismorfias e visceromegalias. As

doenças do segundo grupo apresentam forte relação com a alimentação do paciente, podendo causar intoxicação aguda e recorrente ou crônica e progressiva. E as do terceiro grupo caracterizam-se por manifestações clínicas decorrentes de alterações de produção e consumo energéticos, provenientes de distúrbios do fígado, miocárdio, músculo e cérebro (Saudubray & Charpentier, 1995). De acordo com a nova classificação proposta por Saudubray & García-Cazorla (2018), o Grupo 1 compreende doenças do metabolismo intermediário de pequenas moléculas, como as acidúrias orgânicas (o qual a deficiência de biotinidase se encontra); as aminoacidopatias, como Fenilcetonúria e Tirosinemia; as alterações no ciclo da ureia, como a deficiência da ornitina transcarbamilase, e as alterações no metabolismo dos açúcares, como a galactosemia clássica e a intolerância hereditária à frutose. A figura 1 mostra um apanhado geral dos erros inatos do metabolismo classificados dentro do grupo um:

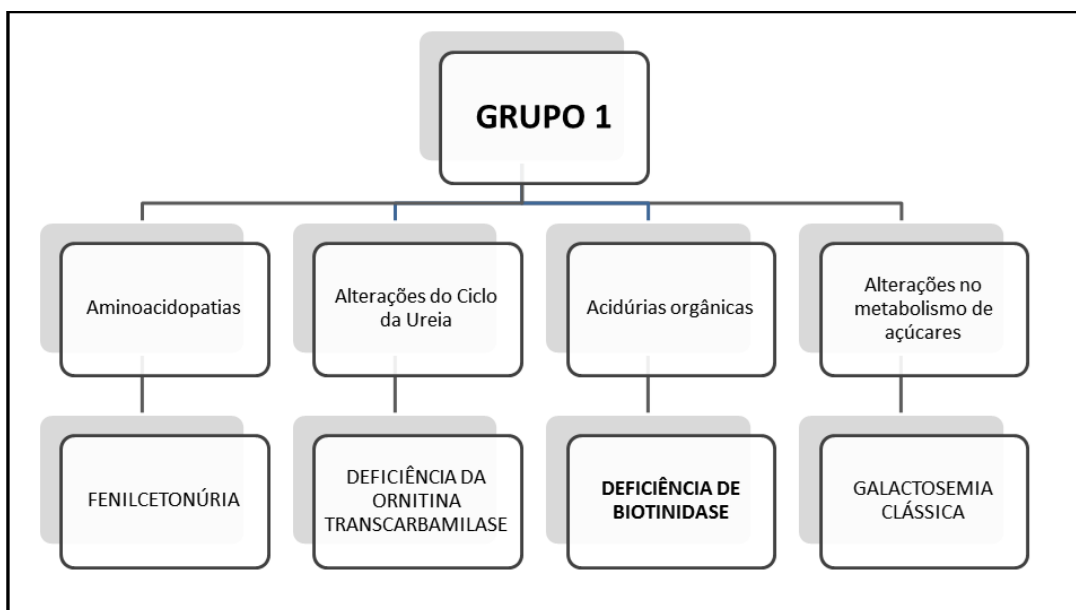


Figura 1: Erros inatos do metabolismo classificados no grupo 1: alterações que envolvem o metabolismo intermediário, com intoxicação aguda e recorrente ou crônicas e progressivas Adaptado de Saudubray & García-Cazorla (2018).

O grupo 2 abrange as doenças do metabolismo energético primário, como por exemplo as que envolvem defeitos no transportador de piruvato ou na piruvato carboxilase, e doenças que envolvem o ciclo de Krebs. Já o grupo 3 envolve o metabolismo de moléculas complexas, que acometem organelas como os

lisossomos, peroxissomos ou complexo de Golgi, como as mucopolissacarídeos ou as glicogenoses.

1.2 Biotina, Ciclo da Biotina e Deficiência de Biotinidase

A biotina, conhecida como vitamina B7 é uma vitamina do complexo B presente em diversos alimentos, como carnes vermelhas, cereais e em outras fontes, como observado na figura 2. A biotina foi descoberta em 1927, mas passaram-se 40 anos até que ela realmente fosse classificada como uma vitamina (Wolf, 1990).

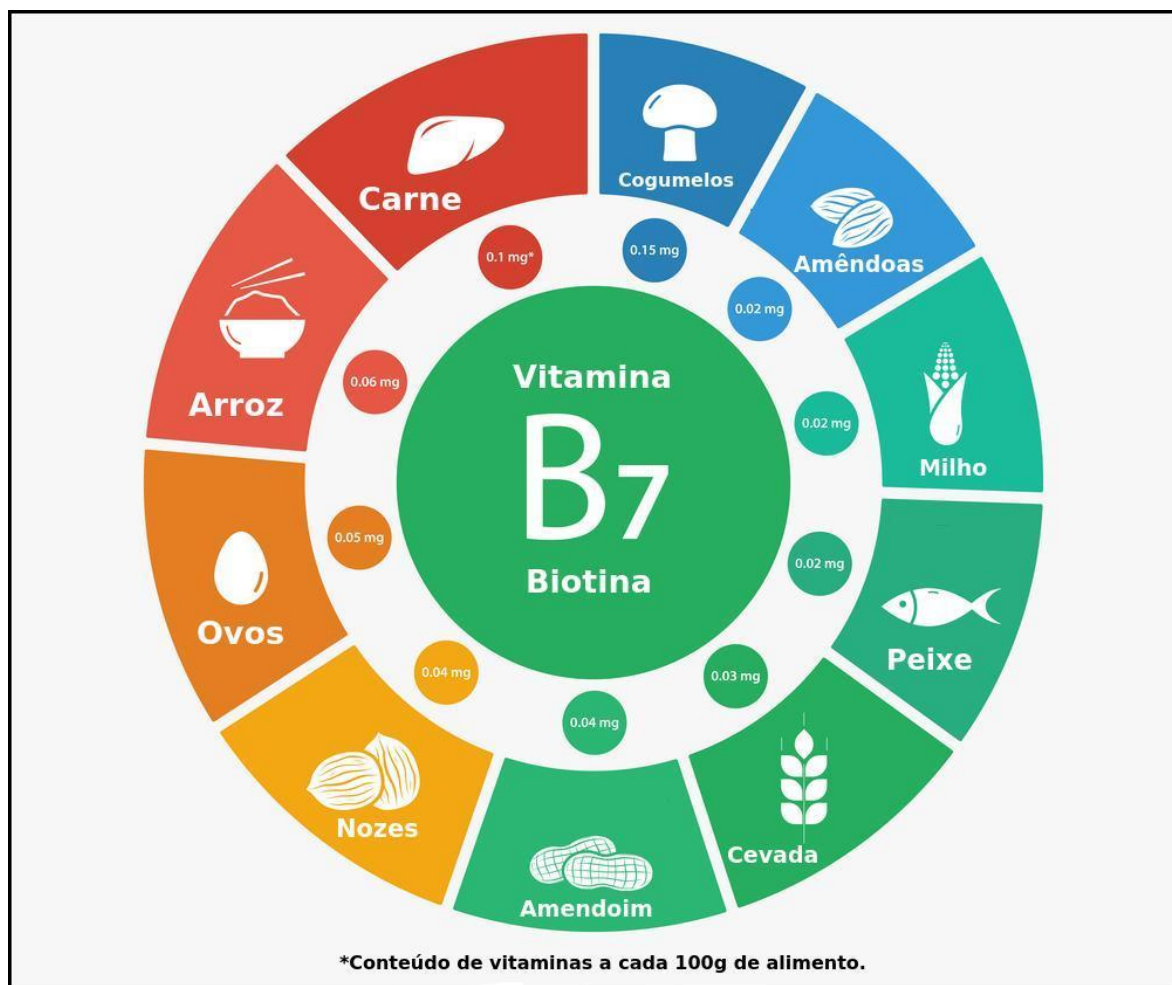


Figura 2: Principais fontes de biotina da nossa dieta. Indivíduos adultos necessitam de uma ingestão de 30µg de Biotina ao dia. Adaptado de: <https://appreciategoods.com/vitamin-b7-biotin/>.

A biotina pode ocorrer na forma livre ou ligada a proteínas através de uma lisina, mais especificamente a biocitina. A enzima biotinidase (EC 3.5.1.12) é responsável por liberar a biotina da biocitina podendo então a biotina livre ser

absorvida pelo intestino (Said, 2009). A biotina atua como coenzima para as carboxilases: acetil-coenzima A (CoA) carboxilase (EC 6.4.1.2), codificada pelo gene *ACC*; propionil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.3), codificada pelo gene *PCCA*; β -metilcrotonil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.4), codificada pelo gene *MCCC2* e piruvato carboxilase (EC 6.4.1.1), codificada pelo gene *PC*. No turnover das proteínas celulares, as holocarboxilases são degradadas e a biotinidase é responsável por regenerar biotina livre (Hymes & Wolf, 1996). Além da atividade de hidrolase, essa enzima atua como carreadora de biotina e biotinil-transferase, podendo transferir biotina para histonas (Chauhan & Dakshinamurti, 1986, Hymes *et al.*, 1995, Hymes & Wolf, 1999), entretanto, essa função ainda não está bem esclarecida. O ciclo da biotina pode ser visto na figura 3:

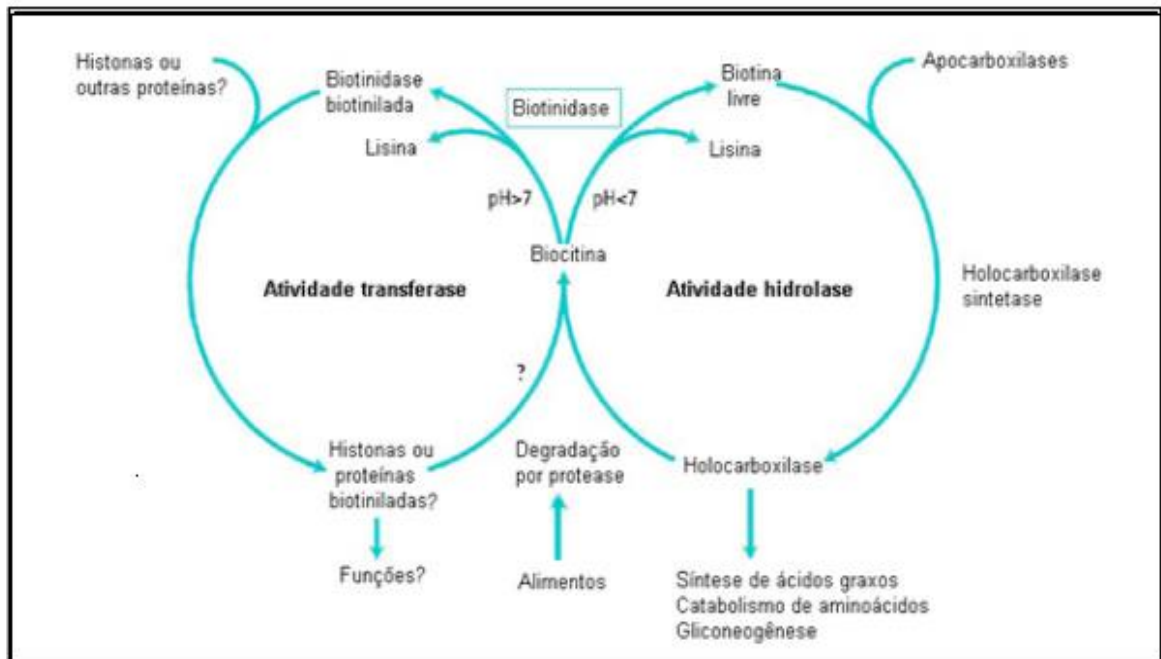


Figura 3. O ciclo da biotina. A enzima biotinidase é responsável por clivar a biotina ligada às proteínas dos alimentos e gerar biotina na forma livre. A biotina livre atua como co-fator de várias apocarboxilases - acetil-coenzima A (CoA) carboxilase (EC 6.4.1.2), propionil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.3), β -metilcrotonil-CoA carboxilase (EC 6.4.1.4) e piruvato carboxilase (EC 6.4.1.1) - pela ação da holocarboxilase sintetase, formando assim holocarboxilases ativas. As holocarboxilases são subsequentemente proteolisadas em biocitina e/ou biotinil-peptídeos que são então clivados pela biotinidase, reciclando assim a biotina. Pode ocorrer deficiência isolada de cada uma das carboxilases, deficiência de holocarboxilase sintetase ou de biotinidase. Adaptado de Himes & Wolf (1996).

A deficiência de biotinidase (DB) é uma doença metabólica com padrão de herança autossômico recessivo, na qual a atividade da enzima biotinidase é ausente ou reduzida, resultando em: incapacidade do organismo em usar a biotina fornecida pela dieta, fazer a reciclagem da mesma, e na perda de biocitina pela urina (Baumgartner & Suormala, 2012). Dependendo da atividade enzimática residual, a DB pode ser total ou parcial: menos de 10% e entre 10-30% da média da atividade normal, respectivamente. Heterozigotos apresentam atividade enzimática intermediária entre a dos afetados e das pessoas homozigotas para o alelo selvagem (Wolf *et al.*, 1983). A incidência mundial combinada de deficiência total e parcial é estimada em 1:60.089 nascidos vivos (NV) (Wolf, 1991). Estudos epidemiológicos, baseados em diagnóstico por triagem neonatal, indicam que a frequência da DB combinada no Brasil varia entre 1:6.843 e 1:62.500 NV (Pinto *et al.*, 1998, Neto *et al.*, 2004, Luz *et al.*, 2008). A tabela 1 resume os dados de estimativas da triagem neonatal para deficiência de biotinidase em um intervalo de 1984 a 2008:

Tabela 1: Resumos da estimativa mundial e nacionais de deficiência de biotinidase. Adaptado de Lara *et al.* (2013)

	Mundial	Minas Gerais	Paraná	Nacional
Período	Jan 1984 a Dez 1990	Mar 1994 a Nov 1994	Out 1995 a Nov 1999	Set 2007 a Jun 2008
Nº de casos identificados	DTB = 76 DPaB = 66	DTB = 1 DPaB = 1	DTB = 3 DPaB = 11	DPaB = 11
Nº RN triados	8.532.617	125.000	225.136	182.942
Referência	Wolf (1991)	Lara <i>et al.</i> (2010)	Pinto (1995)	Neto <i>et al.</i> (2004)

DTB = Deficiência Total de Biotinidase; DPaB = Deficiência Parcial de Biotinidase; RN = Recém Nascidos

O amplo espectro clínico da DB inclui: problemas dermatológicos, neurológicos e metabólicos (Wolf *et al.*, 1983; Wastell *et al.*, 1988). Se o tratamento não é iniciado em tempo, há risco de danos irreversíveis como perda auditiva, visual e retardo mental, de coma e de morte (Wastell *et al.*, 1988, Bay *et al.*, 2010). Crianças com DB parcial não tratadas podem exibir sintomas mais leves que podem surgir apenas quando a criança passa por um período de estresse, como uma infecção prolongada ou alimentação inadequada (McVoy *et al.*, 1990). Além disso, indivíduos com DB podem apresentar acidúria orgânica, cetoacidose metabólica, lactacidemia e hiperamonemia (Wolf, 2003).

Pacientes com DB podem ser identificados antes do aparecimento dos sintomas por ocasião da triagem neonatal. No Brasil, a triagem para DB foi incluída no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) pela Portaria nº 2829/GM/MS de 14.12.12, e é oferecida por serviços públicos e privados. A triagem é realizada através da medida da atividade da biotinidase em sangue seco impregnado em papel-filtro, e o diagnóstico é confirmado pela medida da atividade em soro.

1.3 Métodos de diagnóstico

O conhecimento aprofundado acerca dos Erros Inatos do Metabolismo torna-se indispensável na prática clínica, para que o aconselhamento familiar possa contemplar o prognóstico do paciente e o risco de recorrência da doença, considerando-se a vastidão da sua sintomatologia e a complexidade dos mecanismos que as permeiam (Sanseverino *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2002).

Um dos testes mais utilizados mundialmente para triagem neonatal é o colorimétrico, em que se mede a capacidade de liberação do substrato artificial N-biotinilp-aminobenzoato (BPABA), proposto por Wolf *et al.* (1990). Após sua liberação, o BPABA reage com os reagentes utilizados no teste, produzindo cor de acordo com a quantidade liberada, que geralmente resulta em tons de rosa. A reação ocorre em pH 6,5 e deve-se tomar cuidado ao fazer a dosagem quantitativa da biotinidase por tal método, pois a coleta e estocagem inadequada das amostras podem influenciar nos resultados de valores da enzima. Existem

também métodos que utilizam como substrato natural a biocitina e derivados da biotina, como a biotina-6-amidoquinolina (Wolf, 2003).

O diagnóstico molecular pode ser feito de forma a complementar os testes supracitados, mas ainda não é realizado por laboratórios de rotina no Brasil. A análise genética é importante na diferenciação de indivíduos com DB total daqueles com DB parcial e, de indivíduos com DB parcial dos que são heterozigotos, quando testes enzimáticos repetidos são discordantes – ou seja, ora a atividade enzimática detectada está na faixa da DB total, ora na faixa da DB parcial, por exemplo. A discordância entre testes enzimáticos consecutivos ocorre principalmente devido a fatores ambientais, como temperatura de transporte a armazenamento da amostra (Cowan *et al.*, 2010).

O tratamento da DB consiste na suplementação oral de biotina livre (5-20mg/dia) ao longo de toda vida. As crianças com DB identificadas por triagem neonatal têm os sintomas prevenidos com a terapia (Wastell *et al.*, 1988; Wolf, 2010).

Até o presente momento, no The Human Gene Mutation Database (HGMD, Stenson *et al.*, 2017) já foram relatadas cerca de 236 mutações no gene *BTD*. Conforme ilustra a figura 4, o gene *BTD* que codifica a biotinidase humana, é um gene constitutivo localizado no locus 3p25.1, e composto por quatro éxons e três íntrons, de modo geral a região 3'UTR possui 329pb. O mRNA apresenta dois potenciais códons de início de tradução (AUG) (Stanley *et al.*, 2004; Pindolia *et al.*, 2010), e a estrutura tridimensional da biotinidase predita por modelagem computacional apresenta dois domínios (Pindolia *et al.*, 2007). A proteína possui 543 aminoácidos (Uniprot: P43251) e a enzima demonstra ter atividade de biotinil transferase (Uhlén *et al.*, 2005). Segundo o The Human Protein Atlas, a biotinidase é mais expressa no fígado, rins e estômago (Uhlén *et al.*, 2010).

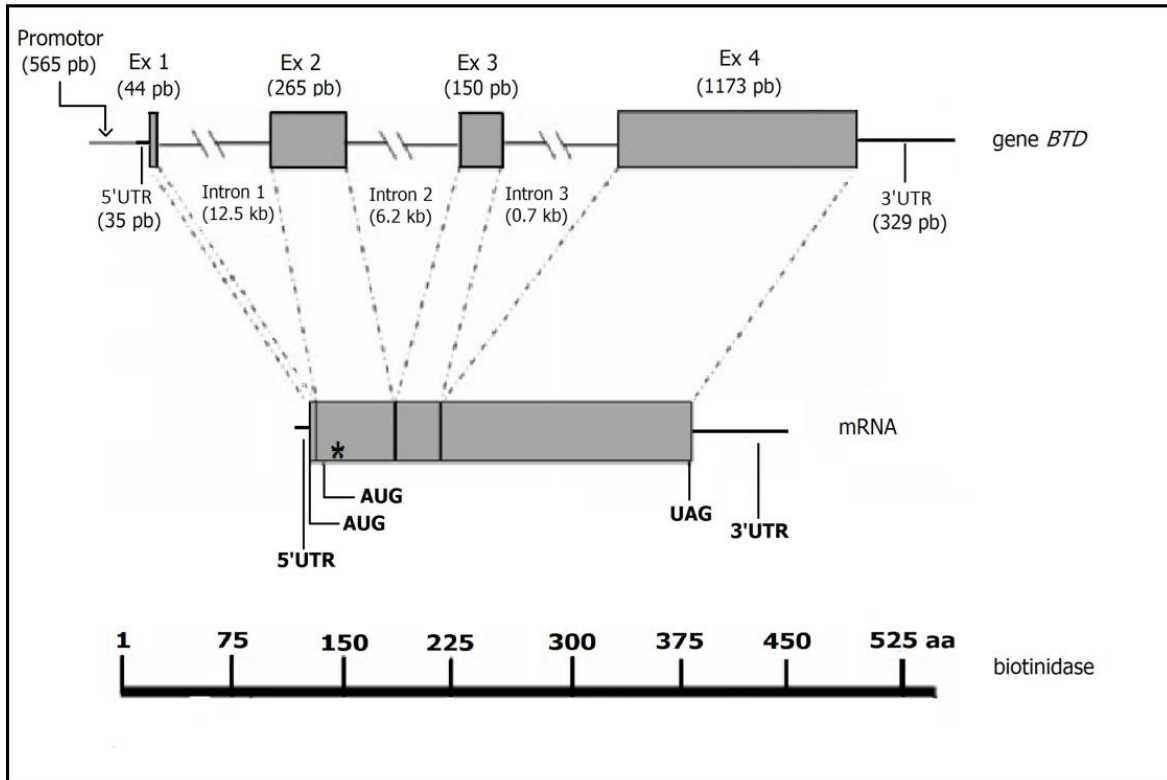


Figura 4. Organização do gene que codifica a biotinidase (*BTD*), seu mRNA e peptídeo resultante. O asterisco indica a posição correspondente ao N-terminal da proteína madura. Adaptado de Pindolia *et al.* (2010).

A maioria das variantes do gene *BTD* causa perda completa ou quase completa da atividade da biotinidase, e são chamadas de alelos da deficiência total de biotinidase. De modo geral, pacientes com DB parcial têm um alelo p.Asp444His em combinação com um alelo da deficiência total de biotinidase, como resumido na Tabela 2:

Tabela 2: Bases moleculares da deficiência de biotinidase. Adaptado de Borsatto *et al.* (2014).

Deficiência de Biotinidase			
TOTAL		PARCIAL	
Alelo da deficiência total +		Alelo da deficiência total +	
Alelo da deficiência total		p.Asp444His	
Indivíduos não afetados			
-HZ	HZ	-N	N
p.Asp444His +	Alelo da deficiência total +	Alelo selvagem +	Alelo selvagem +
p.Asp444His	Alelo selvagem	p.Asp444His	Alelo selvagem

Essa variante é a mais relatada em pacientes com deficiência parcial de biotinidase, é uma mutação do tipo *missense* que resulta na substituição de uma histidina por um aspartato na posição 444 da proteína (Swango *et al.*, 1998). Espera-se que pessoas homozigotas para a variante p.Asp444His tenham aproximadamente 45-50% da média da atividade sérica normal da biotinidase, o que é similar à atividade dos heterozigotos para DB total, indivíduos heterozigotos não necessitam de tratamento (McVoy *et al.*, 1990).

1.4 Explorando as regiões não codificantes: o admirável mundo da região 3'UTR

Com os avanços nas técnicas de biologia molecular, as regiões não codificadoras dos genes foram amplamente reconhecidas e estão emergindo na aplicação em diagnóstico molecular. Em particular, as regiões não traduzidas (UTR) do RNA mensageiro estão envolvidas em mecanismos de regulação pós-transcricional, que controlam a localização, estabilidade e eficiência de tradução do mRNA (Pesole *et al.*, 2001).

Além disso, a regulação da expressão gênica é obtida por meio da interação entre uma vastidão de mecanismos complexos que podem ser basicamente divididos em dois grupos distintos: o primeiro envolve o controle da

transcrição mediada pela ação de elementos que atuam em *cis* como promotores, potenciadores, silenciadores (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001); e o segundo grupo abrange elementos que controlam a eficiência da tradução geralmente localizados nas regiões 5'UTR e 3'UTR (Sonenberg, 1994; McCarthy e Kollmus, 1995; Pesole *et al.*, 1997; Bashirullah *et al.*, 1998).

Em eucariotos, o transcrito primário ou pré-mRNA é convertido em mRNA maduro através de mecanismos de processamento do RNA, que incluem a adição de um grupamento 7-metilguanossina (cap 5') na extremidade 5'UTR; o splicing (remoção de íntrons) e formação da cauda Poli-A na 3'UTR. O processamento ocorre concomitante a transcrição, logo, tais processos são intimamente relacionados (Bentley, 2005).

Ao se tratar da terminação da transcrição, a terminação mediada pela RNA polimerase II depende majoritariamente da existência do sinal de poliadenilação (poli(A)). O sinal poli(A) é a sequência que serve como sinal para indicar o final do gene, e é encontrada na região 3' não traduzida (Proudfoot & Brownlee, 1976). O sinal consenso em mamíferos é caracterizado pelos hexâmeros AAUAAA ou AUUAAA (Beaudoing *et al.*, 2000).

Nos eucariontes superiores, todos os mRNAs maduros que codificam para proteínas (com exceção das histonas) possuem uma cauda contendo de 150 a 200 adenosinas (Vagner *et al.*, 2000). Essa sequência não aparece no gene, pois é inserida posteriormente. Estudos demonstram que a cauda poli(A) está relacionada com a estabilidade do mRNA e com a sinalização do transporte do núcleo em direção ao citoplasma (Harrison *et al.*, 2015).

O estudo de Jankovic *et al.* (1990) reportou duas mutações de ponto que alteram os sinais de poliadenilação na beta-talassemia, cujo impacto relaciona-se com a forma mais severa da doença. Outro estudo relata que a variante c.*231A>G no gene *FMR1*, próxima do sinal de poliadenilação possui frequência relativamente alta em pacientes com Síndrome do X-frágil e estudos posteriores comprovaram que é causadora da doença, mas parece acarretar fenótipos atenuados em meninos (Mumm *et al.*, 2015). Outra variante em 3'UTR no gene *GLA* gera transcritos aberrantes na doença de Fabry e parece ter impacto importante na formação da proteína (Yasuda *et al.*, 2003). Muitos estudos na área

do câncer indicam também a existência de variantes em 3'UTR, como a variante rara no gene *TP53* (rs78378222) que causa predisposição ao câncer na Síndrome de Li-Fraumeni (Macedo *et al.*, 2016). Em súpula, já foram descritas variantes na região 3'UTR cujo acometimento perpassa doenças hematológicas, imunológicas, neurológicas, oncológicas e endócrinas (Curinha *et al.*, 2014), e a figura 5 mostra as principais doenças relacionadas à mecanismos envolvendo modificações na região 3'UTR:



Figura 5: Resumo das alterações em elementos regulatórios presentes na região 3'UTR do mRNA em doenças humanas. (Adaptado de Pal *et al.*, 2016).

Existem muitas proteínas que regulam a expressão gênica, do mesmo modo existem elementos cuja interação RNA:mRNA também são capazes de regular a expressão gênica em resposta a diferentes estímulos ambientais, tais moléculas podem ser ribonucleoproteínas ou riboreguladores (Riboswitches) (Yao *et al.*, 2013; Mccown *et al.*, 2018).

As ribonucleoproteínas são importantes para a maioria dos processos celulares, são complexos formados a partir da junção de proteínas de ligação ao RNA (RBP) e moléculas de RNA. As ribonucleoproteínas são cruciais para manter o correto processamento e funcionamento do RNA, principalmente nos mecanismos de splicing e tradução (Mihailovic *et al.*, 2017). Já os riboreguladores são como “sensores” da presença de determinados metabólitos no meio celular, e foram primeiramente descritos em procariotos onde são mais elucidados. Estas moléculas podem adotar conformações diferentes na presença ou na ausência de um determinado metabólito, e desse modo o mRNA pode ou não ser expresso (Mccown *et al.*, 2018). Os riboreguladores controlam diversas vias metabólicas, tais como a de biossíntese da vitamina B12 e a via do metabolismo da lisina e metionina (Wincker & Breaker, 2005), entretanto nunca foram caracterizados relacionados à biotina.

Elementos ricos em AU (em inglês, AU rich elements) são elementos adenilados e uridinados localizados nas regiões 3'UTR de genes e são relacionados a processos de decaimento do RNA mensageiro (Bakheet *et al.*, 2018). Os elementos ricos em AU estão presentes em cerca de 63% dos genes do genoma humano. Em câncer, estão relacionados com o controle da divisão e proliferação celular, apoptose, angiogênese e processos metastáticos (Khabar, 2017).

Dessa maneira pode-se inferir que muitos dos mecanismos de regulação da expressão gênica são dependentes dos fatores relacionados ao processamento do RNA, que em sua maioria estão presentes nas regiões 3'UTR dos genes.

1.5 Desbravando o Universo dos miRNAs

Com os avanços nas técnicas utilizadas, os RNAs começaram a ganhar enfoque nas práticas laboratoriais. A regulação por meio destas pequenas moléculas é um campo que ainda conota muitos estudos promissores. Moléculas de RNA são cruciais em uma vastidão de processos que ultrapassam aqueles envolvidos no transporte e na síntese proteica. De acordo com o proposto por Brosnan *et al.* (2009), sabe-se que além dos RNAs ribossomais, transportadores e pequenos nucleares, também existem outras classes de RNAs não codificantes (ncRNAs), atualmente divididas em:

- Pequenos ncRNAs, sendo eles os miRNAs e RNAs de interferência;
- Longos, ou lncRNAs, podendo ser os insensíveis, antisense, intergênicos e intrônicos;

O primeiro miRNA a ser estudado foi em uma linhagem de *Caenorhabditis elegans* e está relacionado ao controle do desenvolvimento larval (Lee *et al.*, 1993). Embora descobertos em 1993, foi somente em 2001 que os miRNAs foram caracterizados como famílias de pequenos RNAs não codificantes com participação em processos regulatórios, podendo estar associados a um único gene ou a centena deles (Bartel, 2018). Posteriormente, uma vasta expansão de estudos demonstrou a conservação dos miRNAs com relação a outras espécies de plantas e animais, cuja origem evolutiva remota 525 milhões de anos (Shu *et al.*, 1999; Baldrich *et al.*, 2018).

Segundo a versão 22 do banco miRBase (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014), para a espécie humana já foram identificadas 1917 sequências de miRNAs precursores e 2654 maduros (levando em consideração a versão GRCh38 do genoma humano), e tais sequências são distribuídas no nosso genoma como evidenciado na figura 6A. Acredita-se que dentre os miRNAs submetidos a banco de dados, cerca de 50% estão associados a genes de animais, 36% de plantas, 26% de vírus e 3% de genes de organismos protistas, respectivamente. A comparação do repertório de miRNAs com relação a genomas de diferentes espécies pode ser compreendida através da figura

6B:

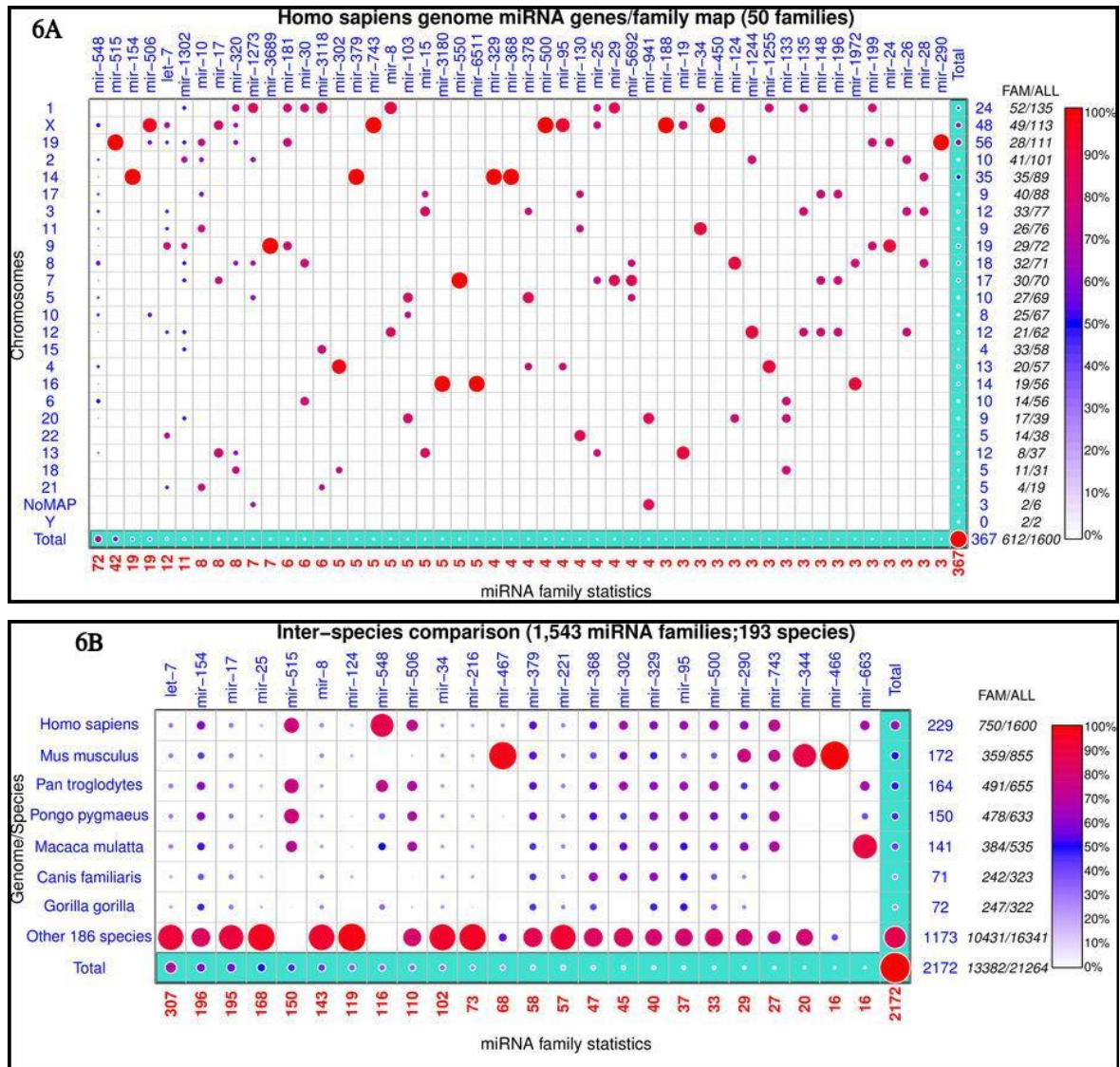


Figura 6: Distribuição dos miRNAs em genomas intra e inter espécies. Foram empregados os dados depositados no miRBase através da ferramenta miRNAVISA. A figura 6A mostra o mapa de 50 famílias de miRNAs no genoma humano; a figura 6B faz um panorama entre as principais espécies modelo experimentais e a espécie humana. A escala em tons de azul representa valores próximos a 0% e os tons de vermelho os valores próximos ou iguais a 100% de correspondência. (Adaptado de Kamanu *et al.*, 2013).

A maioria destes miRNAs encontra-se conservada com relação a outras espécies, um ponto forte no que diz respeito à identificação de alvos em genes e genomas, que serve como parâmetro na maioria dos preditores *in silico*. Outro fator relevante no estudos dos miRNAs se refere ao pareamento na região alvo. Conforme Agarwal *et al.* (2015), o pareamento canônico entre mRNA:miRNA dá-se

através de ligações perfeitas (sítios 8mer) e imperfeitas (como sítios 7mer e 6mer). Ao se falar em evolução, os miRNAs possuem famílias taxonômicas que perpassam as mais diversificadas espécies. Todos os seres vivos possuem classificações taxonômicas, e nas últimas décadas pesquisadores não mediram esforços para categorizar os miRNAs. A estas famílias dá-se o nome de *clusters*, e acredita-se que miRNAs pertencentes ao mesmo *cluster* podem regular a expressão de proteínas envolvidas em uma mesma via metabólica (Yuan *et al.*, 2009). A classificação dos miRNAs dentro de famílias específicas permite que façamos questionamentos como:

- Quais características podem ser estudadas para compreender as relações entre miRNA e potenciais alvos?
- Como a distribuição genômica de genes de miRNA anotados em famílias pode ser resumida e comparada em diferentes genomas?
- Quais informações podem ser inferidas quando sabemos algo sobre a distribuição genômica dos genes de miRNA, sua organização (co-localização espacial em cromossomos específicos) e características dos seus clusters?
- Quais são os mecanismos envolvidos entre miRNAs e vias metabólicas? E como sua desregulação acarreta doenças?

Todas as perguntas acima podem ser respondidas através de estudos *in silico* e com validações experimentais. A inferência e descoberta dos papéis reguladores dos genes de miRNA, sejam eles agrupados em famílias ou co-localizados apresenta grandes potenciais para o diagnóstico, prognóstico e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de inúmeras doenças e síndromes.

A abundância desses miRNAs em determinados órgãos ou tecidos é resultado dos processos de biossíntese e degradação (Kim *et al.*, 2010). A biogênese é o processo onde, a partir de um dado gene de miRNA e de sua transcrição, ocorre a maturação do miRNA e sua agregação ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). De modo geral, a transcrição dos genes

de miRNAs é mediada pela RNA polimerase II, a mesma responsável pela transcrição de genes que codificam proteínas (Sun *et al.*, 2008).

Os miRNAs são produzidos a partir de um RNA precursor, cuja estrutura lembra um grampo (em inglês, *hairpin*). Esta estrutura recebe o nome de pri-miRNA, como visto na figura 7. Este grampo é constituído por um RNA dupla fita, que é processado dentro do núcleo das células e pode ocorrer simultaneamente ao processo de transcrição gênica (Morlando *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009).

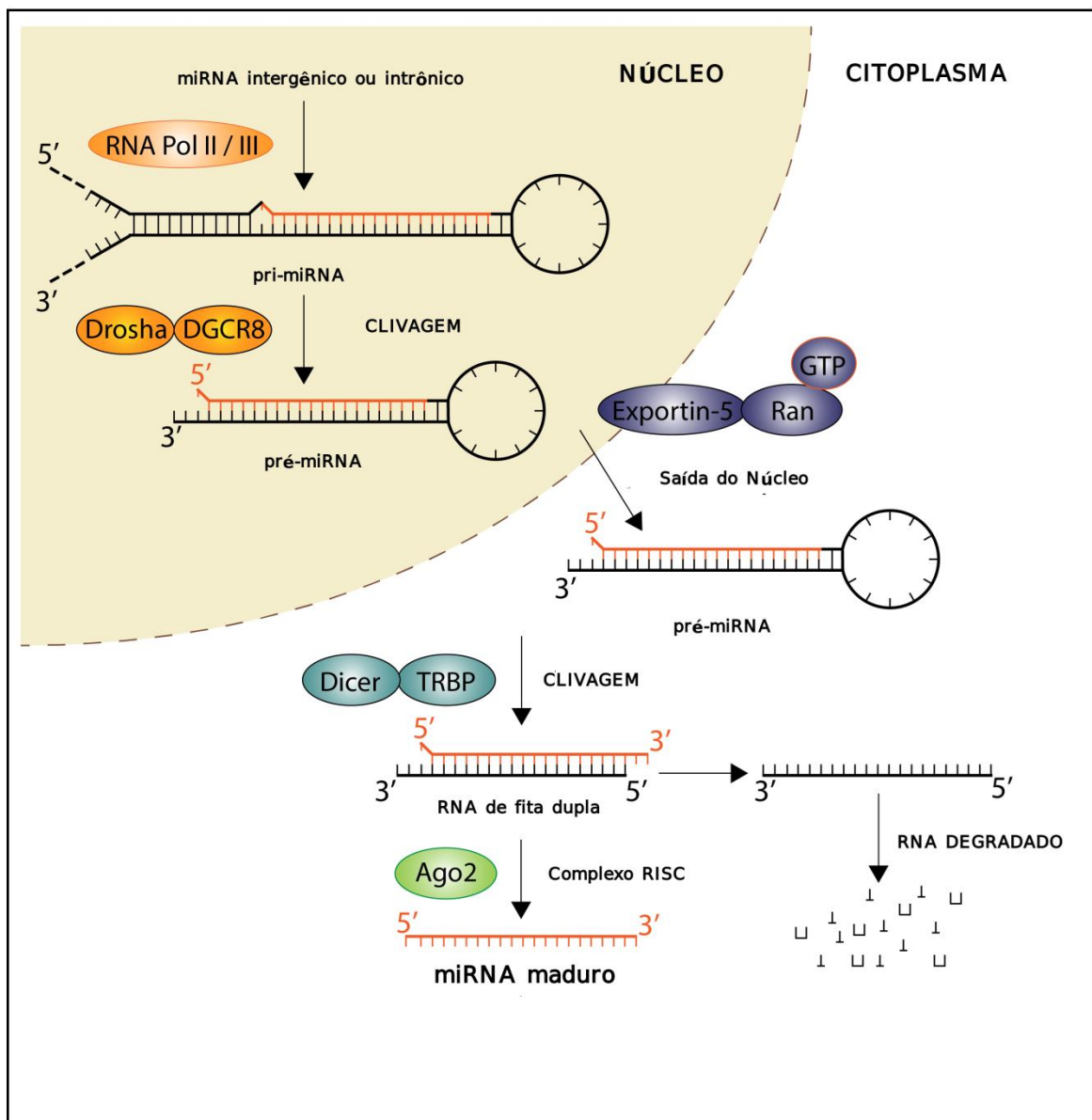


Figura 7: Etapas da biossíntese de miRNAs. (Adaptado de <https://www.vectorbiolabs.com/mirna-aav-adenovirus/>)

Após o processamento pela Drosha, o miRNA precursor (pré-miRNA) é encaminhado para o citoplasma através da exportina-5, e neste local são processados pela enzima Dicer, que incorpora este miRNA ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que fará a separação das duas fitas do RNA, a fita que deu origem ao miRNA sofre a maturação, ao passo que a complementar é degradada (Amaral *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Em estudo prévio do nosso grupo constatou-se discordância entre o fenótipo bioquímico (atividade enzimática) e o genótipo de pacientes com atividade reduzida da biotinidase (Borsatto *et al.*, 2014). As discordâncias entre genótipo e fenótipo bioquímico podem ser explicadas por fatores não genéticos (como icterícia, prematuridade, interferências ambientais sobre a amostra de plasma destinada ao teste enzimático) ou por fatores genéticos ainda desconhecidos, como variantes em região regulatória do gene que codifica a biotinidase (*BTD*).

A região 3'UTR do gene *BTD* nunca havia sido analisada em pacientes com DB. Esta região é sítio de ação de reguladores pós-transcricionais que influenciam na expressão gênica. Variantes em sítios regulatórios podem afetar a estabilidade do mRNA ou afetar os locais de ligação dos miRNAs ao gene alvo, o que pode causar silenciamento gênico via inibição da tradução ou degradação do mRNA.

3.HIPÓTESES

Variantes localizadas na região 3'UTR do gene *BTD* podem influenciar no nível de expressão do gene e conseqüentemente na atividade da enzima biotinidase, e assim explicar as discordâncias observadas entre o genótipo e o fenótipo bioquímico nos pacientes com DB. Além disso, outros elementos presentes nesta região, como modificações no sinal de poliadenilação, elementos ricos em AU, modificações na estrutura secundária do RNA e a influência de miRNAs poderiam estar envolvidos nas alterações acima citadas.

4. OBJETIVOS

- Caracterizar os elementos regulatórios da região 3'UTR do gene *BTD*;
- Identificar variantes na região 3'UTR do gene *BTD* de pacientes com atividade reduzida de biotinidase que possam explicar as discrepâncias observadas entre genótipo e fenótipo bioquímico.

5. RESULTADOS

Os resultados da presente dissertação serão apresentados na forma de artigo a ser submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*.

**Characterization of the 3'UTR region of the *BTD* gene and
identification of regulatory elements and microRNAs in individuals with
reduced biotinidase activity**

SILVA, GCV; SPERB*, F-L^{1 2}; SCHWARTZ, IVD.^{1 2 3 4}.

¹ Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² BRAIN Laboratory, Center for Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

³ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

⁴ Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author; fsperb@gmail.com Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil;

Abstract

Introduction: The reduced biotinidase activity is associated with a spectrum of deficiency ranging from total deficiency to heterozygous-compatible levels, and there is no perfect association between the presence of pathogenic mutations in the *BTBD9* gene. 3'UTR regions are sites of action of transcriptional regulators that influence gene expression, including microRNAs (miRNAs). The investigation of miRNAs with targets in *BTBD9* and other regulatory elements, as well as the characterization of variants in the 3'UTR region, may present relevance in the understanding of the genotype-phenotype relationship. **Objectives:** 1) To characterize the regulatory elements of the 3'UTR region of the *BTBD9* gene; 2) to identify variants in patients with reduced biotinidase activity that may explain the discrepancies observed between genotype and biochemical phenotype. **Methodology:** We evaluated 92 patients with reduced biotinidase activity (level of heterozygotes = 33, borderline (Partial / Hz and Hz / N) = 35, partial DB = 20 or total = 4). The 3'UTR region of the *BTBD9* gene was amplified by PCR and sequenced by the Sanger method. In silico analyzes were performed to identify miRNAs associated with the *BTBD9* gene, analyzes of the secondary structure were performed with the RNAfold package. Polyadenylation signals were identified by the APASdb bank and the PolyA_svm algorithm, and AU rich elements by RegRNA and ARE SITE. **Results:** All analyzed sequences showed 100% homology to the reference sequence. Possible miRNAs associated with the *BTBD9* gene and the genes involved in biotin metabolism were found. In addition, 6 AU-rich elements associated with the 3'UTR region of *BTBD9* were found, possibly involved in mRNA decay, regulation of instability and response to cellular stress. **Conclusion:** To date, there are no strongly validated interactions between miRNAs and the *BTBD9* gene, which leaves its experimental validation from a future perspective. This study allowed to conclude that variants in the 3'UTR region of the *BTBD9* gene that encodes the biotinidase enzyme do not explain the discrepancies found between the genotype and the biochemical phenotype of patients with reduced biotinidase activity.

Keywords: 3'UTR, genetic variants, microRNAs, AU-rich elements, biotin, biotinidase.

Introduction

The enzyme biotinidase (EC 3.5.1.12), encoded by the *BTD* gene, catalyzes the cleavage of biocytin into the vitamin biotin, which acts as a cofactor for several carboxylases, such as pyruvate carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and acetyl-CoA carboxylases 1 (alpha) and 2 (beta) (Wolf *et al.*, 2001). Once biotin and associated peptides have been released, they are absorbed by the intestine (Said, 2009).

Biotinidase deficiency (BD) is a metabolic disease, inherited in an autosomal recessive pattern, which makes the body unable to assimilate biotin from the diet and may inhibit biotin recycling (Baumgartner & Suormala, 2012). If not treated early, BD may lead to neurological and dermatological disorders (Wastel *et al.*, 1988). BD may be complete (activity <10% of average normal activity) or partial (10-30%). There is an association between certain genotypes and the observed biochemical phenotype (complete or partial), but in some patients, genotype and phenotype are mismatched. According to previous research by our group, correlation between the expected biochemical phenotype (according to genotype) and the actual biochemical phenotype occurs in 68.5% of cases, and mutations in the 5'UTR region of *BTD* do not seem to explain the variations found (Borsatto *et al.*, 2014; Borsatto *et al.*, 2017).

The objective of this study was to characterize the 3'UTR region of the *BTD* gene, with the intention of identifying and evaluating how the regulatory regions of this gene could influence expression of the enzyme it encodes. In addition, we sought to identify variants in the 3'UTR region of the *BTD* gene in Brazilian patients with reduced biotinidase activity; as well as to investigate possible miRNAs associated with the *BTD* gene and other post-transcriptional regulation mechanisms, such as alternative polyadenylation signals, AU-rich elements, and other mechanisms that could be modifying the expression or genes that participate in biotin metabolism.

Methods

This study was approved by the local Research Ethics Committee (registration no. 16-0480). The subjects consented to participation in the project “*Avaliação genética e aspectos clínicos de pacientes brasileiros com deficiência de biotinidase*”, previously approved by the Graduate Research Group (GPPG) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre under registration number 12-0186.

The study included 92 patients with reduced biotinidase activity: 33 at heterozygous level, 19 borderline partial/heterozygous, and 16 borderline heterozygous/normal. Of these, 20 had partial deficiency and 4 had total deficiency. The molecular profile of each patient is shown in Table 1. These patients had already 5'UTR and all exons (1-4) sequenced in the previous study cited above (Borsatto *et al.*, 2014; Borsatto *et al.*, 2017).

Genetic analysis

The *BTD* gene is composed of 4 exons, and its 3'UTR region has 329 bp. The corresponding mRNA has two potential start codons (AUG) (Stanley *et al.*, 2004, Pindolia *et al.*, 2010), and the three-dimensional structure of biotinidase as predicted by *in silico* modeling consists of two domains (Pindolia *et al.*, 2007). For genomic DNA extraction, blood samples were collected in EDTA-containing tubes and processed using the Easy-DNA gDNA Purification kit (Thermo Fisher). The 3'UTR region of the *BTD* gene was amplified by PCR with specific primers. The products were purified with 20% PEG 8000/2.5M NaCl and Sanger-sequenced. Sequences were analyzed in the Chromas Lite software environment and aligned with the reference sequence NG_008019.1 in Blast/NCBI.

To evaluate conservation of the 3'UTR region of *BTD*, sequence alignments between different species were performed in MEGA software (version 7.0.26, Kumar *et al.*, 2016), using the ClustalW algorithm (version 2.1, Thompson *et al.*, 1994). Evolutionarily conserved regions were mapped in ECR Browser (Ovcharenko *et al.*, 2004). The chromosomal position provided in the Atlas of UTR Regulatory Activity (AURA) (Dassi *et al.*, 2014) was used to locate the 3'UTR region of *BTD*.

Analysis of miRNAs and other regulatory elements

To investigate miRNAs that might regulate *BTD* expression, we used miRBase (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014), miRTarBase (Chou *et al.*, 2018), StarBase (Li *et al.*, 2014), TarBase (Vlachos *et al.*, 2015), and TargetScanHuman (Agarwal *et al.*, 2015) software.

The miRanda (Bino *et al.*, 2004), mirSVR (Betel *et al.*, 2010), and microRNA.org (Betel *et al.*, 2007) algorithms were used for analysis of target sites of the miRNAs found to be associated with *BTD*. The cutoff points for this analysis were a binding free energy of -25Kcal (proposed as more stable by Seffens & Digby, 1999) and the search for evolutionarily conserved targets (mainly 8-mer), as suggested by Garcia *et al.* (2012).

For polyadenylation analysis, the constitutive site was determined according to the reference sequence curated by NCBI. After identification of the largest sequence, the APADB (Müller *et al.*, 2014) and APASDB (Leiming *et al.*, 2015) databases and the Poly_a_svm (Structural Support Vector Machine) algorithm of the RegRNA package (v. 2.0, Chang *et al.*, 2013) were used to quantify usage of these sites and polyadenylation signals.

To identify other regulatory elements present in the 3'UTR region, such as AU-rich elements, RegRNA v. 2.0 (Chang *et al.*, 2013) and ARE SITE (Gruber *et al.*, 2011). Secondary structures formed by miRNA–3'UTR interaction of the *BTD* gene were obtained through the RNAfold Web server (Gruber *et al.*, 2008).

Results

On analysis of the 3'UTR region of the *BTD* gene, all sequences showed 100% homology to the reference sequence, i.e., no variant was identified.

Conservation analysis shows that the 3'UTR region of the *BTD* gene is highly conserved in primates, whereas in other species analyzed, there are conserved regions, but with limited identity, as observed in Figure 1.

Alignments between the 3'UTR sequence of *BTD* in humans and its rat, mouse, cow, dog, rhesus monkey, and chimpanzee homologs revealed sequence identities of 73.1%, 71.6%, 70.6%, 72.1%, 94%, and 99%, respectively.

In silico analysis of miRNAs associated with *BTD* gene yielded highly variable results; the miRBase database predicted 45 miRNAs with sites in the *BTD*

gene, versus 11 by miRTarBase, 2 by StarBase, 22 by TarBase, and 2 by TargetScanHuman (Table 2).

Regarding prediction analysis of miRNA target sites in the *BTD* gene, the highest-scoring miRNAs as ranked by the databases used in the study were analyzed. Seven sites were identified (Table 3). Regarding biotin metabolism, 49 miRNAs associated with genes that interact with the *BTD* gene were identified (Table 4).

The three best-predicted secondary structure models are presented in Figure 2. Secondary structure prediction serves as an additional parameter for analysis of target sites, and, in some cases, can even lead to discovery of new miRNAs.

The polyadenylation signal used by the *BTD* gene coincides with the canonical AAUAAA hexamer, and is located in the 3'UTR region. The dinucleotide that characterizes the cleavage site is described as AA. Results from the APASdb database and the PolyA_svm algorithm show that the *BTD* gene has two major mapped polyadenylation sites. The first signal begins at position 2044 and is 32 nucleotides in length; the second signal begins at position 2329 and is also 32 nucleotides long. According to the APADB database, both polyadenylation sites of the *BTD* gene are located in the 3'UTR region. These polyadenylation sites were identified, with a greater quantification of site usage, at positions chr3:15687323 (86.1%) and chr3:15683749 (11.4%). Six AU-rich elements were identified in humans and different species (Table 5).

DISCUSSION

The 3'UTR region had never been characterized in patients with BD, and the degree of conservation observed among the 92 patients analyzed in the present study has expected. Variant databases report a low frequency of variants in the 3'UTR region of *BTD*. The fact that the two most frequent variants according to the genome aggregation database (gnomAD) are c.*15C>T (0.01%) and c*24G> A (0.007%) demonstrates its high degree of conservation. It bears stressing that this database covers data from 123,136 exomes and 16,000

genomes of approximately 60,000 individuals from different parts of the world (Lek *et al.*, 2016).

The major miRNAs associated with the *BTD* gene, as predicted by search tools, were hsa-miR-7-5p, previously implicated in suppression of cell proliferation, induction of apoptosis, and angiogenesis (Li *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2018); hsa-miR-34a-5p, which is involved in cell proliferation and an important regulator of the central nervous system (Agostini & Knight, 2014; Jauhari *et al.*, 2016); and hsa-miR-145, identified in neonates and expressed specifically in the liver, where biotinidase expression is also higher (Fu *et al.*, 2005).

The miR-7 cluster is known to be associated with genes related to the nervous system. Dostie *et al.* (2003) demonstrated that this miRNA may be dysregulated in neuronal cells in spinal muscular atrophy, and is strongly likely to be involved in the neurological dysfunctions associated with Waisman syndrome and fragile X syndrome. If left untreated, BD may lead to neurological problems and developmental delay. Thus, it is important to note that this miRNA, along with several potentially related factors, may be a candidate for investigation.

Hearing loss is a common sensorineural impairment in general populations. Experiments done on the inner ear of mice and humans have found differential expression of five miRNAs, among them miR-30, associated with different stages of development of this organ (Rudnicki & Avraham, 2012). In the present analysis, miR-30 was associated with the *BTD* gene. Among patients with total biotinidase deficiency, 75% of affected children have hearing loss (Wolf *et al.*, 2002), of variable but usually irreversible severity.

miRNAs associated with genes that interact with *BTD* were identified in the biotin metabolic pathway (Table 4). These miRNAs have already been implicated in cell signaling, glycosylation pathways, and in arginine, biotin, tyrosine, and thiamine metabolism. The *PC* gene that encodes pyruvate carboxylase, a biotin-dependent carboxylase, is found not only in the biotin metabolic pathway but in three others as well: the alanine metabolic pathway, the citrate cycle, and the pyruvate pathway.

Gene ontology analyzes show that these genes participate in several biological processes, and act as coenzymes and in the metabolism of small

molecules (Gene ontology: Fisher's exact with FDR multiple test correction: $9.95e-20 / 1.55e-15$, Mi *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2003).

Among the most prominent results, the *HLCS* target gene stands out. *HLCS* encodes the important holocarboxylase synthetase enzyme, activates biotin-dependent carboxylases, and catalyzes the binding of biotin to biotinidase. Experiments have shown that miR-539 decreases holocarboxylase levels, with the abundance of miR-539 being significantly higher at physiological biotin concentrations than in biotin-deficient and biotin-supplemented media, in all cell lines tested. The results of this study suggest that miR-539 may be one of several factors that detect biotin and regulate holocarboxylase levels (Segura *et al.*, 2013). In the present study, this miRNA was not directly associated to the *BTD* gene, but to the holocarboxylase synthetase gene *HLCS*.

The *SPCS1* and *SPCS3* genes – subunits of the peptidase signal complex that act as hydrolases and participate in degradation of lysines (Kailes & Hartmann, 1996) – also stood out. The lysine present in the biotin-lysine complex (biocytin) is believed to be degraded through the action of this complex. The miRNAs associated with these genes may have an impact on expression of *SPCS1* and *SPCS3* and, consequently, on lysine degradation, preventing biotin from being recycled into its free form. In addition, hsa-miR-204 and hsa-miR-211, both predicted to be associated with *SPCS1*, are implicated in mechanisms of cell proliferation and metastases in several types of cancer, including breast, colon, and lung cancer (Mazar *et al.*, 2010).

Essau *et al.* found that miR-122 allows the liver to function properly in adult mice. This miRNA is an important mechanism for regulation of genes involved in hepatic lipid metabolism. This corroborates the findings of Saha & Ruderman (2003), who observed negative effects on mice lipogenesis whereby a reduction in ACC gene expression, particularly ACC2, led to a decrease in malonyl CoA and subsequent increase in fatty acid oxidation. The biotin acts as a cofactor for several carboxylases, miRNAs may be involved in feedback regulation of this system. This miRNA was not found to be associated with *BTD*, but appears to be involved with citrate and pyruvate metabolism genes.

Based on the assumption that a single miRNA can regulate several target genes, miR-31-3p and miR-34a-5p were associated with the *BTD* gene and with the *PCCA* and *PCCB* genes, which encode subunits of the enzyme propionyl-coA-carboxylase, one of the biotin-dependent carboxylases. Dysfunction in these genes can lead to propionic acidemia, a disease characterized mainly by neurological and cardiac damage. Rivera-Baharona *et al.* (2017) found that these miRNAs are deregulated in the mouse liver; more specifically, overexpression of miR-34 family miRNAs is observed in patients with cardiac involvement, and is associated with other neurodegenerative diseases.

The most appropriate secondary structure model according to RNAfold analysis was the model of interaction between the 3'UTR of the *BTD* gene and hsa-miR-3934, with a binding free energy of -25.35 Kcal. The yellow area corresponds to the mature nucleotide sequence of the analyzed miRNA. As suggested by Lorenz *et al.* (2016), these models can predict the actual nucleotide sequence of mRNA:miRNA pairing with great accuracy, estimated by thermodynamic and minimum free energy (MFE) calculations.

Following this reasoning, Mathews *et al.* (1999) suggest that the MFE parameter is very useful in determining the secondary structure of RNA, as it may help in the detection of evolutionarily important regions. From the data obtained through our analyses, we may infer that the nucleotides written in red are more likely to be more conserved, whereas those written in purple are less likely to be conserved.

With respect to polyadenylation analysis, the cleavage site with the highest quantified usage (chr3:15687323; 86.1%) was located in the 3'UTR region and associated with the canonical polyadenylation signal sequence which is most frequently found in our genome: the AAUAAA hexamer. In addition, the polyadenylation site with the second highest quantified usage (chr 3:15683749; 11.4%) is associated with the second most common polyadenylation signal in the human genome: the variant hexamer AUUAAA, which is also functional.

AU-rich elements characterized for the *BTD* gene in humans were also identified and found to be conserved in different species, which again

demonstrates the evolutionary importance of regulatory elements present in the 3'UTR regions.

These elements have been reported in association with other genes and are involved in countless processes, including cell longevity (Roretz *et al.*, 2010), stress response (Balmer *et al.*, 2001), mRNA stability regulation (Doler *et al.*, 2008), HuR protein-mediated regulation (Helfer *et al.*, 2012), transcriptional regulation of oncogenes (Bakheet *et al.*, 2001), and mRNA decay in fibroblasts and in other cell types (Sinsimer *et al.*, 2008)

In addition, another study showed that the TATTTTA heptamer inhibits translation by directly interacting with the polyadenylation signal in human papilloma virus (HPV)-1 (Wiklund *et al.*, 2002). This element has been associated with the *BTD* gene in humans and other species, with a conservation index of 0.7262 (highly conserved).

Conclusions

Study of the 3'UTR region in patients with biotinidase deficiency allowed us to conclude that variants in this region do not explain the genotype–phenotype discrepancies found in clinical practice. A search of regulatory element databases found no riboregulators associated with the *BTD* gene. Due to differences between computational methods, predicted miRNAs are not always the same among the different databases or tools available. To date, there are no strongly validated interactions between miRNAs and the *BTD* gene. Thus, its experimental validation remains as a perspective for future research.

Acknowledgments

This study was funded by the HCPA Research and Event Incentive Fund (FIPE) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The authors would like to thank the staff at the HCPA Medical Genetics Service, with special thanks to those who provide care and follow-up of the patients included in the study.

References

Agarwal, V; Beel, GW; Nam, JW; Bartel, DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **eLife**, 4:1-38.

Alvarez-Garcia, I, Miska, EA (2005) MicroRNA functions in animal development and human disease. **Develop** 132:4653–4662.

Bakheet, T; Hitti, E; Al-Salf, M; Moghrabi WN; Khabar, KSA (2017) The AU-rich element landscape across human transcriptome reveals a large proportion in introns and regulation by ELAVL1/HuR. **BBA Gen Reg Mech**, 1861: 167-177.

Bhattacharyya, SN; Habermacher R; Martine U; Closs, EI; Filipowicz, W (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. **Cell**, 125: 1111–1124.

Borsatto, T et al. (2014) Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 Brazilian patients. **BMC Med Genet**, 15:96.

Borsatto, T et al. (2017) Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. **PloS One**, 12:5.

Carpenter, S; Ricci, EP; Mercier, BC; Moore, MJ; Fitzgerald, KA (2014) Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. **Nat Rev Immunol**, 14:361-76.

Chen, YX; Huang, KJ; Niu, KX (2018) Recent advances in signal amplification strategy based on oligonucleotide and nanomaterials for microRNA detection-a review. **Biosens and Bioelectron**, 99:612-624.

Chou, CH et al. (2018) miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Res**, 46: 296-302.

Dassi, E; Re, A; Leo, S; Tebaldi, T; Pasini, L; Peroni, L; Quattrone, A (2014) Aura 2: Empowering Discovery of post-transcriptional networks. **Transl**, 2(1): e27738.

Dostie, J.; Mourelatos, Z.; Yang, M.; Sharma, A.; Dreyfuss, G. (2003) Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. **RNA**, 9(2): 631-632.

Edwards-Gilbert, G; Veraldi, KL; Milcarek, C (1997) Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? **Nucleic Acids Res**, 25:2547-61.

Fu, H. et al. (2005) Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. **FEBS Lett**, 579:3849-54.

Giraldez, AJ; Mishima, Y; Rihel, J; Grocock, RJ; Van Dongen, S; Inoue, K; Enright, AJ; Schier, AF (2006) Zebrafish miR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. **Science**, 312:75-79.

Griffiths-Jones, S; Saini, HK; Dongen, S; Enright, AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics, **Nucleic Acids Res**, 36: 154–158.

Higgins, DG; Taylor, W (2000) Bioinformatics – Sequence structure and databanks. In: Duret, L.; Abdeddaim, S. Multiple alignments for structural, functional, or phylogenetic analyses of homologous sequences. New York: **Oxford University Press**, 2:92-119.

Kailes, KU, Hartmann, E (1996) Membrane topology of the 12- and the 25-kDa subunits of the mammalian signal peptidase complex. **J Biol Chem** 271: 3925-3929.

Kalman, S; Garbett, KA; Vereczkei, A; Shelton, RC; Korade, Z; Mirnics, K (2014) Metabolic stress-induced microRNA and mRNA expression profiles of human fibroblasts. **Exp Cell Res.**, 15: 343–353.

Kozomara, A; Griffiths-Jones, S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data, **Nucleic Acids Res**, 42: 68–73.

Kumar, S; Stecher, G; Tamura, K (2016) MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol Biol Evol**, 33: 1870-1874.

Leiming, Y et al. (2015) APASdb: a database describing alternative poly(A) sites and selection of heterogeneous cleavage sites downstream of poly(A) signals. **Nucleic Acids Res**, 43:59-67.

Lek, M. et al. (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, 536:285-291.

Li, JH; Liu, S; Zhou, H; Qu, L-H; Yang, JH (2014) StarBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein–RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. **Nucleic Acids Res**, 42:92-97.

Li, Y ; Wen, L; Wei, X; Wang, Q-R; Xu, L-R; Zhang, H-M; Liu, W-C (2016) Inhibition of miR-7 promotes angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells by upregulating VEGF via KLF4. **Oncology Reports**, 36:1569-1575.

Luo, H. et al. (2018) miR-7-5p overexpression suppresses cell proliferation and promotes apoptosis through inhibiting the ability of DNA damage repair of PARP-1 and BRCA1 in TK6 cells exposed to hydroquinone. **Chem Biol Interac**, 283:84-90.

Mazar, J; DeYoung, K; Khaitan, D; Meister, E; Almodovar, A; Goydos, E; Ray, A; Perera, RJ (2010) The Regulation of miRNA-211 Expression and Its Role in Melanoma Cell Invasiveness. **PLoS ONE**, 5(11): e13779.

Mi, H; Muruganujan, A; Thomas, PD (2013) PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. **Nucleic Acids Res**, 41:377-386.

Muller, S. et al. (2014) APADB: database for alternative polyadenylation and microRNA regulation events. **Database Oxford**, 21:2-11.

Noh, J. H. et al. (2013) miR-145 functions as a tumor suppressor by directly targeting histone deacetylase 2 in liver cancer. **Cancer Letters**, 335(2):455–462.

Ovcharenko, I; Nóbrega, MA; Loots, GG; Stubbs, L (2004) ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. **Nucleic Acids Res**, 32:280-286.

Pathak et al. (2017) Deciphering the Role of microRNAs in BRD4-NUT Fusion Gene Induced NUT Midline Carcinoma. **Bioinfo**, 13(6): 209–213.

Rajendiran, S; Parwani, AV; Hare, RJ; Dasgupta, S; Roby, RK; Vishwanatha, JK (2014) MicroRNA-940 suppresses prostate cancer migration and invasion by regulating MIEN1. **Mol Cancer**, 13: 250.

Reuter, M; Elgelstadter, J; Fontanillas, P; Hurst, LD (2008) A test of a null model for 5'UTR Evolution based on GC content. **Mol Biol Evol**, 25: 801-804.

Rivera-Barahona, A; Fulgencio-Covian, A; Perez-Cerda, C; Ramos R; Barry, MA; Ugarte, M; Perez, B; Richard, E; Desviat, LR (2017) Dysregulated miRNAs and their pathogenic implications for the neurometabolic disease propionic acidemia, **Scientific Reports**, 7(1): 1-11.

Rudnicki, A; Avraham, KB (2012) microRNAs: the art of silencing in the ear. **EMBO Mol Med**, 4(9), 849–859.

Saha, AK; Ruderman, NB (2003) Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase: an expanding partnership. **Mol Cell Biochem.** 253:65–70.

Said, HM (2009) Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption. **J Nutr**, 139(1):158-62.

Salehi, Z; Akrami, H (2017) Target genes prediction and functional analysis of microRNAs differentially expressed in gastric cancer stem cells MKN-45. **J Can Res Ther**, 13:477-83.

Savan, R (2014) Post-transcriptional regulation of interferons and their signaling pathways. **J Inter Cytok Res**, 34(5):318-29.

Segura, LG; Andrade, MP; Ríos, JM (2013) The Emerging Role of MicroRNAs in the Regulation of Gene Expression by Nutrients. **J Nutrigenet Nutrigenom**; 6:16–31.

Thomas, PD; Campbell, MJ; Kejariwal, A; Mi, H; Karlak, B; Daverman, R; Diemer, K; Muruganujan, A ; Narechania, A (2003) PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. **Gen Res**, 13: 2129-2141.

Thompson, JD; Higgins, DG; Gibson, DJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, 11(22): 4673–4680.

Tian, B; Hu, J; Zhang, H; Lutz, CS (2005) A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. **Nucleic Acids Res**, 33(1):201-12.

Tomasetti, M; Amati, M; Santarelli, L; Neuzil, J (2016) MicroRNA in Metabolic Re-Programming and Their Role in Tumorigenesis. **Int J Mol Sci.**, 17(5): 754.

Vlachos, IS et al. (2015) DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. **Nucleic Acids Res**, 43:153-159.

Wang, H-J et al. (2013) Characterization and Identification of novel serum microRNAs in sepsis patients with different outcomes. **Shock**, 39(6):480-7, e3182940cb8.

Wastell, HJ; Bartlett, K; Dale, G; Shein, A (1988) Biotinidase deficiency: a survey of 10 cases. **Arch Dis Child**, 63:(10)1244-9.

Winkler, WC; Breaker, RR (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. **Annu Rev Microbiol** 59:487-517.

Wolf, B (2001) Disorders of biotin metabolism, in: C.R. Scriver, Beaudet, AL; Sly, WS; Valle, D (Eds.), **TMMBI** , 3935–3962.

Wolf B, Spencer RF, Gleason AT (2002) Hearing loss is common in symptomatic children with profound biotinidase deficiency. **J Pediatr**, 140: 242-46.

Wong, N; Wang, X (2015) miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. **Nucleic Acids Res**, 43(1)146-152.

Xu, K; Liang, X; Cui, D; Wu, Y; Shi, W; Liu, J (2013) miR-1915 inhibits Bcl-2 to modulate multidrug resistance by increasing drug-sensitivity in human colorectal carcinoma cells. **Mol Carcinog**, 52(1):70-8.

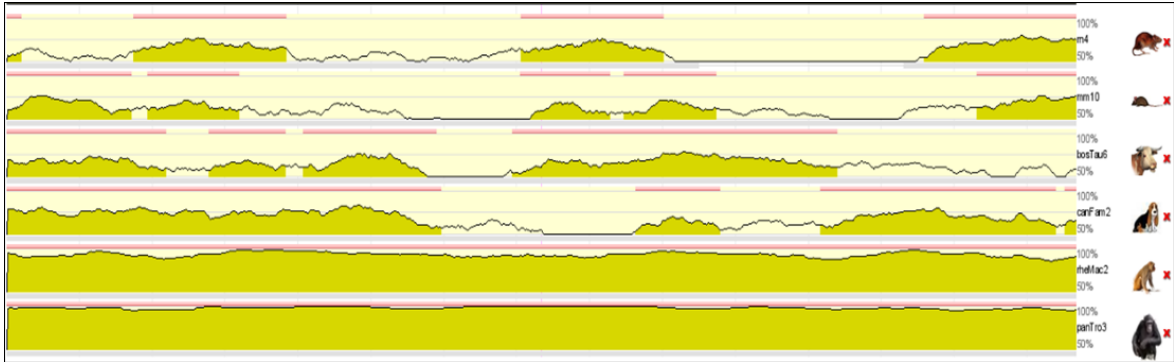


Figure 1 - Analysis of evolutionarily conserved regions through the ECR Browser. The yellow area indicates the sequence of the 3'UTR region of the *BTB* gene in different species: rat, mouse, cow, dog, rhesus monkey, and chimpanzee. The pink bars indicate the evolutionarily conserved regions using the human genome as a reference. The area chart shows regions with identity greater than 70% as compared to the 3 'UTR region of humans.

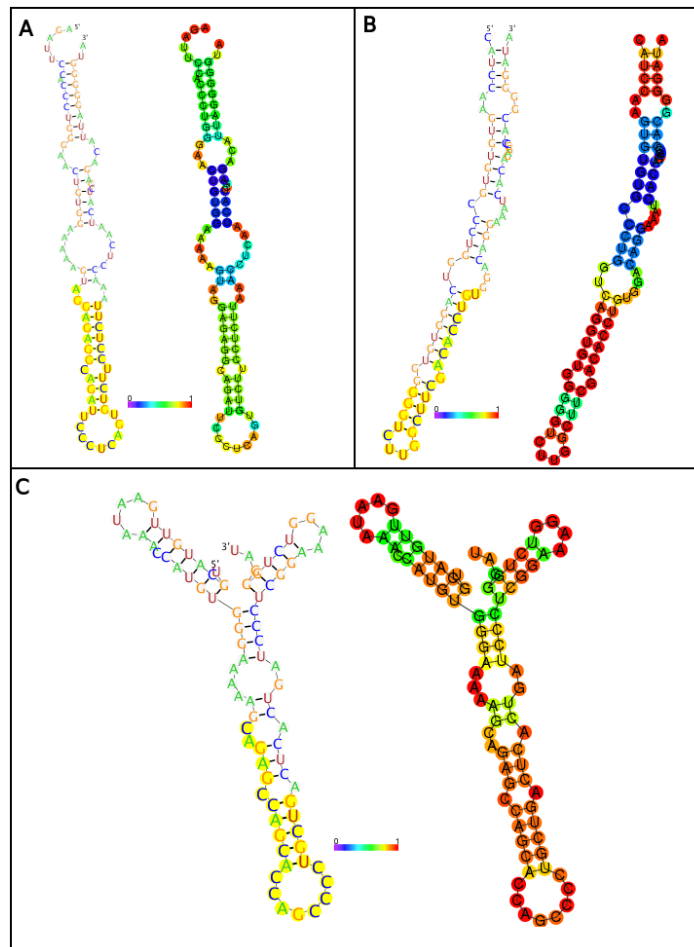


Figure 2 - Secondary structures of the miRNAs obtained through the RNAfold package belonging to the RegRNA 2.0 tool. A-miRNA hsa-miR-3916, B-miRNA hsa-miR-3934, C-miRNA hsa-miR-4763-5p. The models allow us to analyze which nucleotides from the miRNA hairpin, the yellow region shows the mature miRNA and the likelihood of them being associated with the gene in question. The red color corresponds to the highest correlation between free energy binding between miRNA: mRNA and its interaction. That is, the probability of that nucleotide belonging to that position in the secondary structure

Table 1 - Genetic and biochemical profile of patients with reduced biotinidase activity included in the characterization of the 3'UTR region.

Patient	Allele 1	Allele 2	Expected BD according to genotype	Biotinidase activity (nmol/mL)	Type of BD according to enzyme activity
1	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.[595C>A;1413T>C] (p.Val199Met / p.Cys471Cys)	Partial	2,8	Hz
2	c.[1330G>C;643C>T]*	p.Asp444His / p.Leu215Phe*	Partial	2.4	Hz
3	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.511G>A (p.Ala171Thr)	Partial	2.5	Hz
4	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.755A>G (p.Asp252Gly)	Partial	2.4	Hz
5	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1629C>A (p.Asp543Glu)	Partial	2.5	Hz
6	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.755A>G (p.Asp252Gly)	Partial	3.03	Hz
7	c.[1330G>C;1629C>A]*	p.Asp444His / Asp543Glu*	Partial / Hz	2.6	Hz
8	c.[1330G>C;511G>A] (p.Asp444His / p.Ala171Thr)	c.1413T>C (p.Cys471Cys)	Hz	3.3	Hz
9	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	3.3	Hz
10	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	4.6	Hz
11	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	3.2	Hz
12	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	3.0	Hz
13	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	3.0	Hz
14	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	2.8	Hz
15	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	2.6	Hz
16	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	3.7	Hz
17	c.1368A>C (p.Gln456His)	WT	Hz	2.8	Hz
18	c.1413T>C (p.Tyr494Cys)	c.1629C>A (p.Cys471Cys)	Hz	4.0	Hz
19	c.643C>T (p.Leu215Phe)	WT	Hz	3.4	Hz
20	c.1595C>T (p.Thr532Met)	WT	Hz	2.9	Hz

21	c.1595C>T (p.Thr532Met)	WT	Hz	2.9	Hz
22	c.364A>G (p.Arg122Gly)	WT	Hz	3.8	Hz
23	c.[595C>A;1413T>C] (p.Val199Met / p.Cys471Cys)	WT	Hz	3.6	Hz
24	WT	WT	Normal	2.6	Hz
25	WT	WT	Normal	3.3	Hz
26	WT	WT	Normal	4.1	Hz
27	WT	WT	Normal	3.7	Hz
28	c.1330G>C (p.Asp444His)	WT	Normal	3.5	Hz
29	c.1368A>C (p.Gln456His)	WT	Normal	2.6	Hz
30	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1284C>T (p.Tyr428Tyr)	Normal	4.4	Hz
31	c.1330G>C (p.Asp444His)	WT	Normal	3.8	Hz
32	c.1330G>C (p.Asp444His)	WT	Normal	3.1	Hz
33	WT	c.1330G>C (p.Asp444His)	Normal	4.2	Hz
34	c.1330G>C (p.Asp444His)	WT	Partial	2.1	Partial/Hz
35	c.1368A>C (p.Gln456His)	WT	Partial	2.1	Partial/Hz
36	c.[755A>G;1330G>C]*	p.Asp252Gly / p.Asp444His*	Partial	2.1	Partial/Hz
37	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.479G>A (p.Cys160Tyr)	Partial/Hz	2.3	Partial/Hz
38	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	2.2	Partial/Hz
39	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	2.3	Partial/Hz
40	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	2.2	Partial/Hz
41	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	2.3	Partial/Hz
42	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	2.3	Partial/Hz
43	c.278A>G (p.Tyr93Cys)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Hz	2.1	Partial/Hz
44	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.479G>A (p.Cys160Tyr)	Hz	2.3	Partial/Hz
45	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.1337T>C (p.Leu446Pro)	Unknown	2.2	Partial/Hz
46	c.278A>G (p.Tyr93Cys)	WT	Unknown	2.3	Partial/Hz
47	c.278A>G (p.Tyr93Cys)	WT	Unknown	2.2	Partial/Hz
48	c.278A>G (p.Tyr93Cys)	WT	Unknown	2.2	Partial/Hz

49	c.[595G>A;1330G>C;1629C>A]*	p.Val199Met / p.Asp444His / p.Cys471Cys*	Unknown	2.2	Partial/Hz
50	WT	c.278A>G (p.Tyr93Cys)	Hz	2.2	Partial/Hz
51	c.[755A>G;1330G>C]*	p.Asp252Gly / p.Asp444His*	Hz	2.2	Partial/Hz
52	WT	c.1368A>C (p.Gln456His)	Hz	2.1	Partial/Hz
53	WT	c.1330G>C (p.Asp444His)	Normal	4.9	Hz/Normal
54	WT	c.1330G>C (p.Asp444His)	Normal	4.9	Hz/Normal
55	WT	c.1330G>C (p.Asp444His)	Normal	4.9	Hz/Normal
56	WT	c.1330G>C (p.Asp444His)	Normal	4.9	Hz/Normal
57	WT	c.1330G>C (p.Asp444His)	Normal	4.9	Hz/Normal
58	WT	c.1330G>C (p.Asp444His)	Normal	4.9	Hz/Normal
59	c.1330G>C (p.Asp444His)	WT	Normal	5.0	Hz/Normal
60	c.1330G>C (p.Asp444His)	WT	Normal	5.0	Hz/Normal
61	c.1330G>C (p.Asp444His)	WT	Normal	5.0	Hz/Normal
62	WT	c.1629C>A (p.Cys471Cys)	Normal	4.9	Hz/Normal
63	WT	c.1629C>A (p.Cys471Cys)	Normal	5.0	Hz/Normal
64	c.1629C>A (p.Cys471Cys)	WT	Normal	4.9	Hz/Normal
65	c.1629C>A (p.Cys471Cys)	WT	Normal	4.9	Hz/Normal
66	c.1629C>A (p.Cys471Cys)	WT	Normal	4.9	Hz/Normal
67	c.1629C>A (p.Cys471Cys)	WT	Normal	4.9	Hz/Normal
68	WT	WT	Normal	5.0	Hz/Normal
69	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.119T>C (p.Leu40Pro)	Unknown	1.7	Partial
70	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.755A>G (p.Asp252Gly)	Partial	1.9	Partial
71	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.755A>G (p.Asp252Gly)	Partial	1.4	Partial
72	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.755A>G (p.Asp252Gly)	Partial	1.2	Partial
73	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.755A>G (p.Asp252Gly)	Partial	1.8	Partial
74	c.755A>G (p.Asp252Gly)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Partial	1.4	Partial
75	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.[511G>A;1330G>C] (p.Ala171Thr / p.Asp444His)	Partial	1.4	Partial
76	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.[470G>A;1330G>C] (p.Arg157His /	Partial	1.8	Partial

		p.Asp444His)			
77	c.1330G>C (p.Asp444His) c.[1284C>T;1489C>T] (p.Tyr428Tyr / p.Pro497Ser)	c.[470G>A;1330G>C] (p.Arg157His / p.Asp444His)	Partial	1.9	Partial
78		c.1330G>C (p.Asp444His)	Partial	2.0	Partial
79	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.594_596del (p.Val199del)	Partial	1.9	Partial
80	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.594_596del (p.Val199del)	Partial	2.0	Partial
81	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.98_104del (fs)	Partial	1.5	Partial
82	c.1330G>C (p.Asp444His)	c.98_104del (fs)	Partial	1.6	Partial
83	c.[98_104del;1330G>C]*	p.Cys33fs / p.Asp444His*	Partial	2.0	Partial
84	c.[100G>A;1330G>C]*	p.Gly34Ser / p.Asp444His*	Partial / Hz	2.04	Partial
85	c.1368A>C (p.Gln456His)	c.1330G>C (p.Asp444His)	Partial	2.0	Partial
86	WT	c.1330G>C (p.Asp444His)	Normal	1.2	Partial
87	WT	c.1330G>C (p.Asp444His)	Normal	1.2	Partial
88	c.[1330G>C;1629C>A] (p.Asp444His / p.Ala171Thr)	c.1466A>G (p.Asn489Ser)	Unknown	1.4	Partial
89	c.643C>T (p.Leu215Phe)	c.755A>G	Total	0.04	Total
90	c.755A>G (p.Asp252Gly)	c.755A>G	Total	0.44	Total
91	c.1227_1241del (p.Trp409fs)	c.1227_1241del (p.Trp409fs)	Total	0.09	Total
92	c.1612C>T (p.Arg538Cys)	c.1612C>T (p.Arg538Cys)	Total	0.12	Total

Table 2 - Search results for miRNAs associated with the *BTD* gene in different search methods and databases.

miRBase	miRTarBase	StarBase	TarBase	TargetScan
hsa-miR-10b-3p, hsa-miR-1247-3p, hsa-miR-1247-5p, hsa-miR-1267, hsa-miR-1273e	hsa-miR-129-5p, hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-1915-5p	hsa-miR-1915-5p, hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-145-5p
hsa-miR-148a-5p, hsa-miR-1827, hsa-miR-219, hsa-miR-219b-3p, hsa-miR-2467-3p, hsa-miR-302f	hsa-miR-130b-3p, hsa-miR-135a-5p	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-3064-3p, hsa-miR-3691-5p	hsa-miR-3190-3p
hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30d-3p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-3620-3p	hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-299-3p		hsa-miR-3714, hsa-miR-3916	
hsa-miR-367-5p, hsa-miR-3929, hsa-miR-3942-3p, hsa-miR-4652-3p	hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-301b		hsa-miR-4312, hsa-miR-4474-3p, hsa-miR-4640-3p	
hsa-miR-4257, hsa-miR-4419b, hsa-miR-4478, hsa-miR-4649-3p	hsa-miR-340-5p, hsa-miR-454-3p		hsa-miR-4752, hsa-miR-4764-5p, hsa-miR-4786-5p	
hsa-miR-4670-3p, hsa-miR-4722-5p, hsa-miR-4729, hsa-miR-4743-3p, hsa-miR-4768-3p, hsa-miR-5100	hsa-miR-505-3p		hsa-miR-511-3p, hsa-miR-576-3p	
hsa-miR-5584-3p, hsa-miR-5696, hsa-miR-570-3p, hsa-miR-579-3p, hsa-miR-6125, hsa-miR-6499-3p			hsa-miR-6761-5p, hsa-miR-6764-5p, hsa-miR-6798-3p	
hsa-miR-6516-5p, hsa-miR-664a-3p, hsa-miR-664b-3p, hsa-miR-6808-5p			hsa-miR-7-5p, hsa-miR-8066, hsa-miR-877-5p	

hsa-miR-6837-3p, hsa-miR-6893-5p,
hsa-miR-7160-5p,
hsa-miR-940

hsa-miR-887-5p
hsa-miR-891a-3p

Table 3 - Prediction of miRNA target sites in *BTB* according to mirSVR and TargetScanHuman algorithms.

miRNA ID	mirSVR score	Phast Cons score	Type seed	Reference
hsa-miR-6764-5p	0,12	0,55	7mer-m8 (1) 7mer-A1 (1)	Pathak <i>et al.</i> (2017)
hsa-miR-8066	-1,29	0,52	7mer-A1 (1)	Wang <i>et al.</i> (2013)
hsa-miR-940	-0,01	0,44	8mer (1) 6mer(1)	Rajendiran <i>et al.</i> (2014)
hsa-miR-1267	-0.39	0.52	7mer-m8 (2)	Tomasetti <i>et al.</i> (2016)
hsa-miR-5195-3p	-0.08	0.43	8mer (2) 6mer(1)	Salehi <i>et al.</i> (2017)
hsa-miR-34a-5p	-0.01	0.44	7mer-m8 (1)	Kalman <i>et al.</i> (2014)
hsa-miR-1915-3p	-0.80	0.49	7mer-m8 (1)	Migita <i>et al.</i> (2013)

mirSVR and Phast Cons score are related to conservation between the seed region of the miRNA and its target gene. The number in parentheses indicates how many sites of mRNA pairing: miRNA the detected algorithm.

Table 4 - Genes involved in Biotin Metabolism and number of miRNAs predicted to influence the metabolic pathways of alanine, biotin, citrate and pyruvate.

Gene	Location	Description	miRNAs	Metabolism
<i>HLCS</i>	21q22.1	Holocarboxylase Syntetase	8	Biotin
<i>MCCC1</i>	3q27	Methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alfa)	6	Biotin
<i>PC</i>	11q13.4	Pyruvate Carboxylase	14	Alanine, Biotin, Cytrate and Pyruvate
<i>SPCS1</i>	3p21.1	Signal Peptidase Complex subunit 1	10	Biotin
<i>SPCS3</i>	4q34.2	Signal Peptidase Complex subunit 3	11	Biotin

Table 5 – AU rich elements found in 3'UTR of the *BTD* gene.

Motif	Score of conservation
TTTTT	0.8546
ATTTA	0.7487
ATTTT	0.7322
TTTTA	0.7295
TATTTTA	0.7262
AATAAA	0.6497

The conservation score are related to motifs conservation between other species.

6. DISCUSSÃO GERAL

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em regiões UTR podem alterar a conformação da estrutura secundária do RNA, e tal mecanismo verifica-se em doenças como a Síndrome Hereditária da Hiperferritinemia-Catarata. Para esta síndrome foram descritas mais de 30 variantes em UTR, onde parte delas acarreta em alterações em sítios de ribonucleoproteínas (no caso da 3'UTR) e em sítios de entrada do ribossomo (na 5'UTR). Na região 3'UTR, tais variantes também podem alterar os sinais de poliadenilação, levando à repressão traducional (Halvorsen *et al.*, 2010). Neste sentido, destaca-se a importância da análise de regiões reguladoras para algumas doenças. Com relação à análise de variantes da região 3'UTR do presente trabalho, todos os 92 pacientes estudados mostraram 100% de homologia quando comparados a sequência de referência NG_008019.1.

Diversos estudos associam miRNAs a diversas vias metabólicas, uma parte deles diz respeito ao metabolismo do colesterol e da glicose. Compreender os mecanismos da fisiologia da doença e desenvolver novas estratégias de tratamento são abordagens promissoras no uso destes miRNAs (Poy *et al.*, 2007).

Os principais miRNAs preditos pelas ferramentas de busca associados ao gene *BTD* foram:

- hsa-miR-1915-3p, que apresenta expressão diminuída em pacientes com arritmia e associado com Hipercolesterolemia Familiar (Liu *et al.*, 2014; Momtazi *et al.*, 2017);
- hsa-miR-6764-5p, encontrado em diversos tipos de câncer e relacionado com a expressão do gene *BRD4*, relacionado com mudanças na cromatina (Pathak *et al.*, 2017);
- hsa-miR-8066, relacionado com resposta à hipoxia e prognóstico de sepse (Janaszak-Jasiecka *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2013);

- hsa-miR-940, relacionado com migração celular em pacientes com câncer de próstata, também utilizado como biomarcador de diagnóstico e prognóstico em câncer de mama (Rajendiran *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018);
- hsa-miR-1267, que apresenta expressão diminuída em tumores de testículo e conhecido por participar dos mecanismos de apoptose, angiogênese, invasão e migração, bem como metástase (Torkashvand *et al.*, 2016; Tomasetti *et al.*, 2016)
- hsa-miR-5195-3p, cuja expressão é alterada em pacientes com câncer colorretal; câncer gástrico e câncer de mama (Mullany *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2014; Torkashvand *et al.*, 2016)
- hsa-miR-34a-5p, associado com atrofia espinomuscular, e também relacionado à regulação da via de sinalização por *TP53* (Dostie *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2018).

Destes miRNAs listados, apenas dois (hsa-miR-940 e hsa-miR-5195-3p) tiveram *seeds* altamente conservadas (8mer). Esse parâmetro leva em consideração o pareamento perfeito entre a região *seed* do miRNA e seu mRNA alvo, mas nem todos os miRNAs possuem esse tipo de *seed*, o que é levado em consideração por alguns dos preditores utilizados no presente estudo. Levando em consideração o PhastCons score, o miRNA considerado mais conservado com relação a diversas espécies é o hsa-miR-6764-5p. Ao analisar o mirSVR score, o miRNA cuja maior expressão ao se falar do gene *BTD* é o hsa-miR-8066.

Com relação às abordagens computacionais para a investigação de miRNAs, os métodos *in silico* para predição de alvos podem gerar diferenças entre os resultados ou mesmo um certo número de falsos positivos (Yousef *et al.*, 2009). Na busca inicial por miRNAs associados ao gene *BTD*, em um dos preditores verificou-se a existência de 45 miRNAs candidatos a interações com o gene, enquanto que em outros preditores este número era bem reduzido. Nesse contexto, na posterior validação destes resultados, esta diferença possui grande relevância (Chen *et al.*, 2013).

O modelo de estrutura secundária gerado pela análise do RNAfold mais adequado conforme os parâmetros utilizados é o modelo de interação entre a

3'UTR do gene *BTD* e do hsa-miR-3934, cuja energia livre de ligação é -25,35 Kcal. Segundo Lorenz *et al.* (2016) esses modelos conseguem fazer uma predição muito próxima a real sequência de nucleotídeos do pareamento entre mRNA:miRNA, estimada através de cálculos de termodinâmica e de energia livre mínima (MFE). Seguindo esse raciocínio, Mathews e colaboradores (1999) sugerem que o uso do parâmetro MFE é muito útil para determinar a estrutura secundária do RNA, pois pode ajudar na detecção de regiões evolutivamente importantes. Nos dados obtidos através das análises podemos inferir que os nucleotídeos grafados em vermelho possuem maior probabilidade de serem mais conservados, ao passo que os grafados em roxo são menos prováveis de serem conservados (essa correlação vai de 0 a 1). Quanto mais regiões em vermelho, mais confiável o modelo de estrutura predita. A maior parte dos nucleotídeos presentes nas estruturas secundárias preditas mostraram-se altamente conservados.

Conforme analisado, existem dois sinais de poliadenilação descritos para o gene *BTD*. O primeiro é considerado o sinal de poliadenilação canônica, que é encontrado mais frequentemente no nosso genoma: o hexâmetro AAUAAA. Em condições normais, 90% dos genes utilizam preferencialmente este hexâmero (Wahle & Keller, 1996). Adicionalmente, o segundo sinal de poliadenilação caracterizado para o gene *BTD* é reconhecido como sendo o segundo sinal de poliadenilação mais frequente no genoma humano: o hexâmero variante AUUAAA, o qual também é funcional. Embora o sinal AAUAAA seja mais frequente, verificou-se que 10% dos genes utilizam o sinal variante AUUAAA (Colgan & Manley, 1997).

Os elementos ricos em AU encontrados em *BTD* já foram relatados em associação com outros genes, e desempenham inúmeras funções, podendo encontrar-se conservados em humanos, chipanzé e outras espécies. De modo geral, os motivos encontrados associados ao gene *BTD* foram listados a seguir:

- TTTTT, relacionado com longevidade celular (Roretz *et al.*, 2010);
- ATTTA , associado a resposta ao stress (Balmer *et al.*, 2001);
- ATTTT, relacionado a mecanismos de regulação da estabilidade do mRNA (Doler *et al.*, 2008);

- TTTTA, regulação mediada pela proteína HuR (Helfer *et al.*, 2012);
- ATTTT, regulação transcricional de oncogenes (Bakheet *et al.*, 2001);
- TATTTTA, inibe a tradução interagindo diretamente com o sinal de poliadenilação em HPV-1 (Wiklund *et al.*, 2002);
- AATAAA, decaimento do mRNA em fibroblastos, e em outros tipos celulares (Sinsimer *et al.*, 2008);

O elemento rico em AU mais conservado presente em diversas espécies, inclusive no gene *BTD* de humanos é o motivo TTTTT, considerado pela literatura como o mais frequente nos genomas (Terrão *et al.*, 2017). Além do mais, elementos ricos em AU estão presentes em cerca de 63% dos genes do genoma humano. Em câncer, estão relacionados com o controle da divisão e proliferação celular, apoptose, angiogênese e processos metastáticos (Khabar, 2017).

Outros elementos regulatórios preditos como sendo potencialmente encontrados na região 3'UTR do gene *BTD* possuem em média de 7 a 16 nucleotídeos de comprimento, podendo ser encontrados em diversos Metazoários. Dentre eles, destacam-se os Musashi Binding Elements (MBE), que são proteínas de ligação ao RNA evolutivamente conservadas, sendo conhecidas por terem a capacidade de regular a tradução do mRNA (Rentas *et al.*, 2016).

7. CONCLUSÕES

As considerações finais acerca do presente estudo serão explanadas de acordo com os objetivos abaixo:

1) Caracterizar os elementos regulatórios da região 3'UTR do gene *BTD*;

As predições computacionais variam em metodologias de análise de acordo com cada preditor, por isso nem sempre os miRNAs preditos são comuns entre os diferentes bancos de dados ou ferramentas utilizadas. Conforme a busca nos bancos de dados de elementos regulatórios, não foram encontrados riborreguladores associados ao gene *BTD*, e os elementos ricos em AU descritos para o gene *BTD* foram descritos em outras espécies, sendo cruciais para a manutenção e estabilidade do mRNA, servindo como sinalização para *seeds* de miRNAs conservados.

2) identificar variantes em pacientes com atividade reduzida de biotinidase que possam explicar as discrepâncias observadas entre genótipo e fenótipo bioquímico.

Não foram encontradas variantes na região 3'UTR do gene *BTD*, embora houvesse discordância entre o genótipo e fenótipo bioquímico esperado e o encontrado em 32/92 casos analisados. Desta forma, conclui-se que outros fatores devem ser levados em consideração para explicar as imperfeições da associação genótipo vs fenótipo, tais como a influência de modificações epigenéticas (como metilação do DNA no promotor do gene).

Tal região mostrou-se consideravelmente conservada com relação a espécies próximas do *Homo sapiens*, o que nos dá pistas da importância evolutiva das regiões não traduzidas dos genes. Baseado nas análises *in silico*, inferimos que a presença de diferentes sítios de ligação a elementos regulatórios, tais como miRNAs, elementos ricos em AU, ribonucleoproteínas e outros motivos conservados podem explicar o fato desta região não apresentar variantes com frequência elevada nos bancos de dados de coorte brasileira e mundial.

8. PERSPECTIVAS

Até o momento, não existem interações fortemente validadas entre miRNAs e o gene *BTD*, nem entre os elementos ricos em AU preditos computacionalmente, o que deixa como perspectiva futura sua validação experimental.

Além disso, muitos estudos reforçam o papel dos miRNAs servindo como marcadores de diagnóstico, prognóstico e terapêutica para diversas doenças humanas, o que futuramente pode ser extrapolado para diferentes tipos de erros inatos do metabolismo.

O desenvolvimento do presente trabalho deixou como necessidade futura a análise da metilação do promotor do gene *BTD* em pacientes com atividade reduzida da biotinidase, o que pode nos dar pistas sobre as discrepâncias entre fenótipo e genótipo destes pacientes.

9.REFERÊNCIAS

Amaral, BA; Nonaka, CFW; Freitas, RA; Souza, LB; Pinto, LP (2010) MicroRNAs – Biogenesis, functions and its potential role in oral carcinogenesis. **Odontol. Clín.-Cient.**, 9(2):105-109.

Bagga, S; Bracht, J; Hunter, S; Massirer, K; Holtz, J; Eachus, R; Pasquinelli, AE (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. **Cell**, 122:553-63.

Bakheet, T; Frevel, M; Willians, BRG; Greer, W; Khabar, KSA (2001) ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. **Nucleic Acids Res**, 29(1):246–254.

Bakheet, T; Hitti, E; Al-Salf, M; Moghrabi WN; Khabar, KSA (2017) The AU-rich element landscape across human transcriptome reveals a large proportion in introns and regulation by ELAVL1/HuR. **BBA Gen Reg Mech**, (1861)167-177.

Baldrich, P; Beric, A; Meyers, BC (2018) Despacito: the slow evolutionary changes in plant microRNAs. **Curr Opin Plant Biol**, 42: 16-22.

Balmer, LA; Beveridge, DJ; Jazayeri, JA; Thomson, AM; Walker, CE; Leedman, PJ (2001) Identification of a Novel AU-Rich Element in the 39 Untranslated Region of Epidermal Growth Factor Receptor mRNA That Is the Target for Regulated RNA-Binding Proteins. **Molecular and Cellular Biology**, 21(6):2070-2084

Bartel, DP (2018) Metazoan MicroRNAs. **Cell**, 173(1): 20-51.

Baumgartner, ER; Suormala T (1997) Multiple carboxylase deficiency: inherited and acquired disorders of biotin metabolism. **Int J Vit Nutr Res**, 67:377-384.

Beaudoing, E; Freier, S; Wyatt JR, Claverie JM, Gautheret D (2000) Patterns of Variant Polyadenylation Signal Usage in Human Genes. **Genome Res**, 10(7):1001-1010.

Bentley, DL (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. **Curr Opin Cell Biol**, 17:251-256.

Betel,D et al. (2008) The microRNA.org resource: targets and expression. **Nucleic Acids Res**, 36:149-153.

Betel, D et al. (2010) Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. **Genome Biol**, 11(8):90.

Bino, J; Enright, AJ; Aravin, A; Tuschl, A.; Sander, C; Marks, DS (2004) Human MicroRNA Targets. **PLoS Biol**, 2(11).

Borsatto, T et al. (2014) Biotinidase deficiency: clinical and genetic studies of 38 brazilian patients. **BMC Med Genet**, 15:96.

Brosnan, CA; Voinnet, O (2009) The long and the short of noncoding RNAs. **Curr Opin Cell Biol**, 21:416 – 425.

Carpenter, S; Ricci, EP; Mercier, BC; Moore MJ; Fitzgerald, KA (2014) Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. **Nat Rev Immunol**, 14(6):361-76.

Chang TH, Huang HY, Hsu JB, Weng SL, Horng JT, Huang HD (2013) An enhanced computational platform for investigating the roles of regulatory RNA and for identifying functional RNA motifs. **BMC bioinfo**, 14:2:S4

Chen, JY; Liu, X; Zhou, X (2013) Evaluating the microRNA targeting sites by luciferase reporter gene assay. **Methods Mol Biol**, 936:117-127.

Cole, H; Reynolds, TR; Lockyer, JM; Buck, GA; Denson, T; Spence, JE; Hymes, J; Wolf, B (1994) Human serum biotinidase. cDNA cloning, sequence, and characterization. **J Biol Chem**, 269(9):6566-70.

Colgan DF, Manley JL. (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. **Genes Dev**, 11:2755–2766.

Cowan, TM; BlitzeR, MG; Wolf,B (2010) Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency. **Genet Med**, 12,(7): 464-70.

Curinha, A; Oliveira, BS; Pereira-Castro, I; Cruz, A; Moreira, A (2014) Implications of polyadenylation in health and disease. **Nucleus**, 5(6):508-519.

Doler, A. *et al.* (2008) Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. **Mol Cell Biol**, 28(8):2608-2625.

Dostie, J.; Mourelatos, Z.; Yang, M.; Sharma, A.; Dreyfuss, G.(2003) Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. **RNA**, 9(2): 631-632.

Edwards-Gilbert, G.; Veraldi, K. L.; Milcarek, C. (1997) Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? **Nucleic Acids Res**, 25(13):2547-61.

Faghihi, MA et al. (2010) Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. **Genom Biol**, 11(5):56.

GARROD AE (1996) The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. **Lancet**, 2(3): 274–282.

Gillis, P; Malter, JS (1991) The adenosine-uridine binding factor recognizes the AU-rich elements of cytokine, lymphokine, and oncogene mRNAs. **J Biol Chem**, 266(5): 3172-7.

Giraldez, AJ; Mishima, Y; Rihel, J; Grocock, RJ; Van Dongen, S; Inoue, K; Enright, AJ; Schier, AF (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. **Science**, 312(5770):75-9.

Griffiths-Jones, S; Saini, HK; Dongen, S; Enright, AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics, **Nucleic Acids Res**, 36:154–158.

Gruber, AR ; Lorenz, R; Bernhart, SH; Neubock, R; Hofacker, IL (2008) The Vienna RNA Web suite. **Nucleic Acids Res**, 36:70-74.

Gruber, AR; Fallmann, J; Kratochvill, F; Kovarik, P; Hofacker, IL (2011) AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. **Nucleic Acids Res**, 39:66-69.

Halvorsen M, Martin JS, Broadaway S, Laederach A (2010) Disease-Associated Mutations That Alter the RNA Structural Ensemble. **PLoS Genet**, 6(8): e1001074.

Harrison, PF; Powell, DR; Clancy, JL; Preiss, T; Boag, PR; Traven, A; Seemann, TA; Beilharz, TH (2015) PAT-seq: a method to study the integration of 3'-UTR dynamics with gene expression in the eukaryotic transcriptome. **RNA**, 21(8)1502-1510.

Heimberg, S. *et al.* (2008) MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105(8): 2946–2950.

Helfer, S; Schott, J; Stoeklin, G; Förstemann, K (2012) AU-Rich Element-Mediated mRNA Decay Can Occur Independently of the miRNA Machinery in Mouse Embryonic Fibroblasts and Drosophila S2-Cells. **PLoS One**. 7(1): e28907.

Hofacker, I.L. (2003). Vienna RNA secondary structure server. **Nucleic Acids Res**, 31: 3429–3431.

Hu, HY; Zheng,Y; Ying, Xu; Hu,H; Menzel, C; Zhou, YH; Wei, C; Khaitovich, P (2009) Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. **BMC Genomics**, 10(1):22-32.

Hymes, J; Wolf, B. (1996) Biotinidase and its roles in biotin metabolism. **Clin Chim Acta**, 255(1):1-11.

Jankovic, L; Efremov, GD; Petkov, G; Kattamis, C; George, E; Yang, KG; Stoming,TA; Huisman, TH (1990) Two novel polyadenylation mutations leading to beta(+)-thalassemia. **Br J Haematol**. 75(1):122-6. PMID: 2375910.

Janaszak-Jasiecka, A; Siekierzycka, A; Bartoszewska, S; Serocki, M; Dobrucki, LW; Collawn, JF; Kalinowski, L; Bartoszewski, R (2018) eNOS expression and NO release during hypoxia is inhibited by miR-200b in human endothelial cells. **BMC Angiogen**, 21(81):1-14.

Kamamu, TKK; Radovanovic, A; Archer, JAC; Bajik, VB (2013) Exploration of miRNA families for hypotheses generation. **Sci Rep**, 3(2940).

KHABAR, SAK (2017) Hallmarks of cancer and AU-rich elements. **Wires RNA**, 8(1): 1368-1393.

Kim, VN; Han, J; Siomo, MC (2010) Biogenesis of small RNAs in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 10(2):126-139.

Knight, HC; Reynolds, TR; Meyers, GA; Pomponio, RJ; Buck, GA; Wolf, B (1998) Structure of the human biotinidase gene. **Mamm Genom** , 9(4):327-330.

Kozomara, A; Griffiths-Jones, S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data, **Nucleic Acids Res**, 42:68–73.

Kumar, S; Stecher, G; Tamura, K (2016) MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol Biol Evol**, 33: 1870-1874.

Lee, RC; Feinbaum, RL; Ambros, V (1993) *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**. 75(5):843-54.

Leiming, Y et al. (2015) APASdb: a database describing alternative poly(A) sites and selection of heterogeneous cleavage sites downstream of poly(A) signals. **Nucleic Acids Res.**, 43:59-67.

Lek, M. *et al.* (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, 536:285-291.

Li, JH; Liu, S; Zhou, H; Qu, L-H; Yang, JH (2014) StarBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein–RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. **Nucleic Acids Res**, 42:92-97.

Liu, J; Ma, L; Wang, Z.; Wang, L; Liu, C; Chen, R; Zhang, J (2014) MicroRNA expression profile of gastric cancer stem cells in the MKN-45 cancer cell line. **ABBS**, 46(2):92-99.

Liu, H; Qin, H; Chen, G-x; Liang, M; Rong, J; Yao, J-p; Wu, Z-k (2014) Comparative expression profiles of microRNA in left and right atrial appendages from patients with rheumatic mitral valve disease exhibiting sinus rhythm or atrial fibrillation. **J Transl Med**, 12:90.

Liu, W; Xu, Y; Guan, H; Meng, H (2018) Clinical potential of miR-940 as a diagnostic and prognostic biomarker in breast cancer patients. **Cancer biomark**, 22:1-7.

Lorenz, R; Wolfinger, MT; Tanzer, A; Hofacker, IV (2016) Predicting RNA secondary structures from sequence and probing data. **Methods**, 103:86-98.

Luz GS, Carvalho MDB, Pelloso SM, Higarashi IH (2008) Prevalência das doenças diagnosticadas pelo Programa de Triagem Neonatal em Maringá, Paraná, Brasil: 2001-2006. **Rev Gaúcha Enferm**, 29(3):446-53.

Macedo, GS et al. (2016) Rare germline variant (rs78378222) in the TP53 3' UTR: Evidence for a new mechanism of cancer predisposition in Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Genet**, 209(3):97-106.

Martins, AM (1999) Inborn errors of metabolism: a clinical overview. **Sao Paulo Med J/Rev Paul Med** , 117(6):251-65.

McCarthy, JEG; Kollmus, H (1995) Cytoplasmic mRNA-protein interactions in eukaryotic gene expression. **TIBS**, 20(5):191-197.

McCown, PJ; Corbino, KA; Stav, S; Sherlock, ME; Breaker, RR (2018) Riboswitch diversity and distribution. **RNA**, 23:995-1011.

McCaskill, JS (1990) The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structure. **Biopolymers**, 29(7):1105-1119.

McVoy, JR; Levy, HL; Lawler, M; Schmidt, MA; Ebers, DD; Hart, PS; Pettit, DD; Blitzer, MG; Wolf, B. (1990) Partial biotinidase deficiency: clinical and biochemical features. **J Pediatr**, 116(1): 78-83.

Meng, Y.; Quan, L.; Liu, A. (2018) Identification of key microRNAs associated with diffuse large B-cell lymphoma by analyzing serum microRNA expressions. **Gene**, 642:205-211.

Mihailovic, MK; Chen, A; Gonzalez-Rivera, JC; Contreras, LM (2017) Defective RNPs, Mistakes in RNA Processing and Diseases. **Biochem**, 56(10):1367-1382.

Montazi, AA.; Banach, M; Pirro, M; Stein, EA; Sahebkar, A (2017) MicroRNAs: New therapeutics targets for Familial Hypercholesterolemia? *Clinic Rev Allerg Immunol*, 54(2):224-233.

Morlando, M. *et al.* (2008) Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. **Nat Struct Mol Biol**, 15 (9):902-909.

Mühl, A; Möslinger, D; Item, CB; Stöckler-Ipsiroglu, S (2001) Molecular characterisation of 34 patients with biotinidase deficiency ascertained by newborn screening and family investigation. **Eur J Hum Genet**, 9(4):237-243.

Mullany, L.E.; Herrick, J. S.; Wolff, R. K.; Stevens, J. R.; Slaterry, M. L. (2016) Association of cigarette smoking and microRNA expression in rectal cancer: Insight into tumor phenotype. **Cancer Epidemiol**, 45:98-107.

Mumm, S et al. (2015) PHEX 3'-UTR c.*231A>G near the polyadenylation signal is a relatively common, mild, American mutation that masquerades as sporadic or X-linked recessive hypophosphatemic rickets. **J Bone Miner Res**, 30(1):137-43.

Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Biotin. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, D.C.: **National Academy Press**; 1998:374-389

Neto, EC et al. (2004) Newborn screening for biotinidase deficiency in Brazil: biochemical and molecular characterizations. **Braz J Med Biol Res**, 37(3):295-299.

Ovcharenko, I; Nóbrega, MA; Loots, GG; Stubbs, L (2004) ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. **Nucleic Acids Res**, 32:280-286.

Pal, JK et al. (2016) Pathological Variations in 3' -Untranslated Regions of Human Genes. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: **Chichester**.

Pathak *et al.* (2017). Deciphering the Role of microRNAs in BRD4-NUT Fusion Gene Induced NUT Midline Carcinoma. **Bioinfo**, 13(6): 209–213.

Pesole, G; Mignone, F; Gissi, C; Grillo, G; Licciulli, F; Liuni, S (2001) Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. **Gene**, 276(2): 73-81.

Pindolia, K; Jensen, K; Wolf, B (2007) Three dimensional structure of human biotinidase: computer modeling and functional correlations. **Mol Genet Metab**, 92(2):13-22.

Pindolia, K; Jordan, M; Wolf, B (2010) Analysis of mutations causing biotinidase deficiency. **Hum Mutat**,31(9):983-91.

Pinto, AL et al. (1998) Prevalence study of biotinidase deficiency in newborns **Rev S P**, 32(2):148-152.

Poy, MN; Spranger, M; Stoffel, M (2007) microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Diabet Obes Metab.** , 2:67-73.

Proudfoot, NJ; Brownlee, GG (1976) 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. **Nature**, 263: 211-214.

Rajendiran, S.; Parwani, A. V.; Hare, R. J.; Dasgupta, S.; Roby, R. K.; Vishwanatha, J. K. (2014) MicroRNA-940 suppresses prostate cancer migration and invasion by regulating MIEN1. **Mol Cancer**, 13: 250.

Rentas, S. *et al.* (2016). Musashi-2 Attenuates AHR Signaling to Expand Human Hematopoietic Stem Cells. **Nature**, 532:508-511.

Roretz, C; Di Marco, Sergio; Mazroui, R; Gallouzi, IE (2011) Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival. **WIREs RNA**, 2(3): 336-347.

Said, HM (2009) Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption. **J Nutr**, 139(1):158-62.

Salmena, L; Poliseno, L; Tay, Y; Kats, L; Pandolfi, PP (2011) A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? **Cell**, 146(3):353-358.

Sanseverino, MTV, Wajner, M; Giugliani, R (2000) Aplicação de um protocolo clínico-laboratorial para identificação de erros inatos do metabolismo em crianças gravemente enfermas. **J Pediatr**, 76(5): 375-82.

Savan, R (2014) Post-transcriptional regulation of interferons and their signaling pathways. *J Interferon Cytokine Res*, 34(5):318-29.

Saudubray, JM; Charpentier, C (1995) Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver CR, Beaudet L, Sly WS, Valle D. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. Chapter 5:327-400.

Seffens, W; Digby, D (1999) mRNAs have greater negative folding free energies than shuffled or codon choice randomized sequences. **Nucleic Acids Res**, 27(7): 1578–1584.

Sethupathy, P; Collins, FS (2008) MicroRNA target site polymorphisms and human disease. **Trends Genet**, 24(10): 489-97.

Shu, DG et al. (1999) Lower Cambrian vertebrates from South China. **Nature**, 402(6757):42-46 .

Sinsimer, KS et al. Chaperone Hsp27, a novel subunit of AUF1 protein complexes, functions in AU-rich element-mediated mRNA decay. **Mol Cell Biol**, 28(17):5223-5237.

Sonenberg, N; Pause, A; Belsham, GJ; Gingras, AC; Donzé, O; Lin, TA; Lawrence, JC (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. **Nature**, 371(6500):762-767.

Souza, CFM; Schwartz IVD; Giugliani, R (2002) Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. **ABrasCo** , 7(1):129-37.

Stanley, CM; Hymes, J; Wolf, B. (2004) Identification of alternatively spliced human biotinidase mRNAs and putative localization of endogenous biotinidase. **Mol Genet Metab**, 81(4):300-312.

Stenson, PD et al. (2017) The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. **Hum Genet**, 136:665–677.

SUN, BK et al. (2008) Small RNAs in development and disease. **J Am Acad Dermatol** , 59: 725-737.

Swango, KL; Demirkol, M; Hüner, G; Pronicka, E; Sykut-Cegielska, J; Schulze, A; Mayatepek, E; Wolf, B (1998) Partial biotinidase deficiency is usually due to the D444H mutation in the biotinidase gene. **Hum Genet**, 102(5):571-575.

Taylor, GA; Lai, WS; Oakey, RJ; Seldin, MF; Shows, TB; Eddy, RL; Blackshear, PJ (1991) The human TTP protein: sequence, alignment with related proteins, and chromosomal localization of the mouse and human genes. **Nucleic Acids Res**, 19(12):3454.

Thompson, JD; Higgins, DG; Gibson, DJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, 11(22): 4673–4680.

Tian, B; Hu, J; Zhang, H; Lutz, CS (2005) A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. **Nucleic Acids Res**, 33(1):201-12.

Tomasetti, M; Amati, M; Santarelli, L; Neuzil, J (2016) MicroRNA in Metabolic Re-Programming and Their Role in Tumorigenesis. **Int J Mol Sci**, 17(5): 754. 4.

Torkshvand, S; Damavandi, Z; Mirzaei, B; Tavallaei, M; Vasei, M; Mowla, SJ (2016) Decreased Expression of Bioinformatically Predicted piwil2-targetting microRNAs, miR-1267 and miR-2276 in Breast Cancer. **Arch Iran Med**, 19(6): 420-425.