Elisa Varella Branco

Caracterização genótipo-fenótipo em novas síndromes associadas ao Transtorno do Espectro Autista

Genotype-phenotype characterization in new syndromes associated with Autism Spectrum Disorders

São Paulo

2019

Elisa Varella Branco

Caracterização genótipo-fenótipo em novas síndromes associadas ao Transtorno do Espectro Autista

Genotype-phenotype characterization in new syndromes associated with Autism Spectrum Disorders

Exemplar Corrigido da dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Genética e Biologia Evolutiva. A versão digital encontra-se na biblioteca deste mesmo instituto.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Rita Passos-Bueno

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Varella-Branco, Elisa
Caracterização genótipo-fenótipo em novas síndromes associadas ao Transtorno do Espectro Autista / Elisa Varella-Branco; orientadora Maria Rita dos Santos Passos Bueno. -- São Paulo, 2019.

107 f. + anexo

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Genética do Autismo. 2. Correlação genótipo-fenótipo. 3. Diferenciação neuronal. 4. SHANK3. 5. TBCK. I. Passos Bueno, Maria Rita dos Santos, orient. II. Título.

Comissão Julgadora

Dr. Bruno Henrique Silva Araujo Torres

Prof(a). Dr(a). Marilene Hohmuth Lopes

Prof(a). Dr(a). Débora Romeo Bertola

Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno

Ao meu avô, José Camilo Maciel Branco (em memória),

exímio professor da vida, meu exemplo de caráter e profissionalismo.

Obrigada por tanto, Pinho!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado da dedicação e envolvimento de muitos. A começar pelos meus pais, Monica e Paulo, e meu irmão, José Henrique, que são minhas maiores fonte de inspiração. Eles que acreditam nos meus sonhos mais que eu mesma. Que sempre me apoiam e não medem esforços pra me ver feliz e realizada naquilo que amo fazer. Obrigada por me ensinarem o amor e o respeito ao próximo. A vocês, todo o meu amor e minha eterna gratidão!

Agradeço a todos os meus avós, que estiveram presentes (no plano físico ou espiritual) em toda a minha trajetória. Que nunca passaram a se interessar tanto pela genética e pelo autismo como agora. Obrigada por tanto carinho, por tanto apoio e por toda dedicação. Vocês sempre serão meus maiores incentivadores! Agradeço ao Webster, meu parceiro e companheiro da vida, pelas horas de estudos e pelos conselhos. Obrigada por acreditar tanto no meu potencial, e por me fazer querer ser melhor todos os dias. Que essa seja mais uma de nossas conquistas juntos! Agradeço ainda a todos os meus familiares, cujos nomes não caberiam nesta página. Obrigada por tanto carinho!

Gostaria de agradecer especialmente a mentora deste trabalho: Profa. Dra. Maria Rita Passos-Bueno, que abriu as portas de seu laboratório, e acreditou nas minhas ideias e no meu potencial. Obrigada Rita por toda sua colaboração, dedicação e paciência. Ter você como orientadora é uma honra pra mim. Talvez você nem imagine, mas o meu sonho era estar exatamente onde estou agora.

Esse trabalho só foi possível também pelo apoio e dedicação de todo o time Lab200. Obrigada por serem mais do que amigos, e por me proporcionarem um ambiente acolhedor e reconfortante sempre. Agradeço em especial a Claudia Ismania Samogy-Costa, por todo companheirismo, colaboração, carinho e confiança. Obrigada por ser minha melhor dupla (no lab ou fora) e por fazer tanto por mim! Obrigada a Mayzinha por toda paciência, pela sua intensa participação na minha carreira acadêmica e por todos os ensinamentos. Obrigada Gerson, pelos cafés científicos e filosóficos, e por todo apoio durante esses anos. Obrigada Lucas Alvizi por esses dois anos compartilhando bancada comigo, por ser amigo e conselheiro em todos os momentos. Obrigada Duda, Cami, Agatha, Júnia, Leticia (intrusa da 200) e Sofia por tornarem tudo tão mais leve e prazeroso. Agradeço ainda a Ana,

Luciano e Dani, e aos alunos do Lab Mayana: Thalita, Luiz e Nani, por todo conhecimento compartilhado, companheirismo e reflexões científicas.

Agradeço especialmente a Dra. Karina Griesi, Dra. Andréa Sertié, Dr. Arquimedes Schaeffer e Frederico Monfardini, que tiveram uma grande participação neste trabalho. Obrigada por toda ajuda, conselhos e apoio de vocês! À todos os funcionários do IB-USP e do Centro de pesquisa sobre o genoma humano e célula tronco. Especialmente à Naila, Simone e Patricia Semedo que foram mestres, amigas e parceiras em muitos momentos.

Apesar do trabalho e dedicação de todas estas pessoas, este estudo só foi possível através do apoio e contribuição de todos os familiares e pacientes autista que depositam sua confiança em nossa equipe. Obrigada especialmente a Associação de Amigos e Familiares da síndrome de Phelan-McDermid. O maior objetivo deste trabalho é contribuir para o bem estar destas crianças.

Este trabalho contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

NOTA DA AUTORA

Esta dissertação de mestrado compreende um trabalho inédito desenvolvido entre os anos de 2017-2019 no Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL, IB-USP).

A apresentação do trabalho seguiu o modelo de divisão em capítulo/artigos, modelo este aceito atualmente pelos programas de pós-graduação do Instituto de Biociências da USP. Dessa forma, são apresentados os dados obtidos que resultaram em um artigo científico publicado em 2019 redigido em inglês, e um outro que ainda está em fase de complementação de experimentos e por isso optei por redigí-lo em português. Ademais, as sessões referentes a introdução e conclusões e discussões gerais estão escritas em português, conforme especificado pelas normas da pós-graduação do IB-USP.

As referências bibliográficas referentes a cada um dos capítulos estão dispostas ao final dos mesmos. A norma bibliográfica escolhida foi a estipulada pela ABNT, exceto para o capítulo do artigo já publicado.

Por fim, em anexo a este trabalho encontra-se o protocolo detalhado padronizado para obtenção de neurônios corticais *in vitro* diferenciados a partir de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), o qual está sendo implementado em nosso laboratório.

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) caracteriza-se como um complexo distúrbio do neurodesenvolvimento de início precoce. Características comuns como isolamento social, interesses restritos, comportamentos estereotipados e repetitivos estão sempre presentes. Estudos genômicos em larga escala levaram a identificação de um grande número de genes associados ao TEA, e consequentemente, novos quadros clínicos e síndromes têm sido caracterizados. Dentre as síndromes mais recentemente associadas ao TEA, gostaríamos de destacar a síndrome de Phelan-McDermid (PMS), e a Hipotonia infantil com retardo psicomotor e características faciais 3 (IHPRF3). Selecionamos como primeira abordagem deste estudo a caracterização genótipo-fenótipo de PMS (ou síndrome da deleção do 22q13.3), visto que os dados existentes neste sentido ainda são conflitantes. A PMS é ocasionada em geral por deleções de diferentes tamanhos que envolvem o gene *SHANK3,* e os dados atuais da literatura sugerem que a deleção de *SHANK3* causa a maioria dos sintomas neurológicos descritos na síndrome. No entanto, ainda não é totalmente resolutivo qual a implicação do tamanho de deleções em *SHANK3* relacionados a variabilidade clínica, e quais outros genes adjacentes contribuem para o fenótipo observado em PMS. Sendo assim, no presente estudo descrevemos pela primeira vez uma casuística brasileira de pacientes com PMS, e os nossos resultados contribuíram para uma melhor caracterização molecular e clínica da síndrome, visto que: estimamos o tamanho mínimo de deleção para o desenvolvimento de comorbidades como problema renal; identificamos um indivíduo atípico com PMS que não apresenta deficiência intelectual; e estimamos a frequência de indivíduos com PMS em uma coorte de TEA e outra de DI. Com segunda abordagem, tendo em vista a falta de compreensão dos mecanismos patofisiológicos da síndrome IHPRF3, optamos por realizar a caracterização de neurônios de indivíduos com essa síndrome (IHPRF3) utilizando a técnica de reprogramação celular. A IHPRF3 é ocasionada por mutações bi-alélicas de perda de função no gene *TBCK* localizado em 4q24 e se caracteriza clinicamente por hipotonia, deficiência intelectual grave e autismo. Há também evidências de que ocorra neurodegeneração do sistema nervoso central e periférico em alguns casos, a qual pode iniciar na infância, justificando então a importância da caracterização de células neuronais de indivíduos afetados. Os nossos resultados mostraram que os neurônios de afetados derivados de iPSC apresentam alterações na morfologia e

expressão de genes relacionados ao neurodesenvolvimento, que corroboram a influência de *TBCK* no desenvolvimento cortical. Apesar da grande heterogeneidade genética observada entre os casos de TEA, os dados de anotação funcional indicam que uma parcela significativa dos genes relacionados ao autismo converge para vias moleculares e biológicas específicas. Delimitar quais os efeitos fenotípicos ocasionados por diferentes mutações em diferentes genes que podem auxiliar na busca por mecanismos moleculares comuns entre os quadros de autismo. Desta maneira, realizar um delineamento clínico e caracterização funcional destas síndromes auxilia na compreensão do TEA como um todo.

ABSTRACT

Autism Spectrum disorders (ASD) are complex neurodevelopmental early-onset disorders presenting with abnormal social behavior and communication, repetitive behavior and restricted interests. Recent advances in large-scale genomic sequencing have identified hundreds of genes associated with ASD, enabling characterization of new syndromes and clinical features. Among the most recent syndromes associated with ASD, here we focus on Phelan McDermid syndrome (PMS), and infantile hypotonia, with psychomotor retardation and characteristic facies 3 (IHPRF3). We performed a genotype-phenotype correlation study for PMS (or 22q13.3 deletion syndrome), since the existing literature in this regard is still conflicting. PMS is caused by deletions involving the *SHANK3*, which are responsible for most of the neurological symptoms in this syndrome. However, how deletion size and whether affected nearby genes impact the PMS phenotype remains to be elucidated. In the present study, we described for the first time a Brazilian cohort of patients with PMS and contributed to the molecular and clinical characterization of the syndrome. We estimated the minimum deletion size for the development of comorbidities; we identified an atypical PMS case lacking intellectual disability; and finally, we estimated the frequency of individuals with PMS in an independent cohort comprising ASD and ID cases. Regarding IHPRF3, in view of the lack of understanding of its pathophysiological mechanisms, we attempted to model IHPRF3 *in vitro* by characterizing the cellular phenotypes of patients' cortical neurons *in vitro*. The IHPRF3 is caused by bi-allelic loss-of-function mutations in the *TBCK* gene, and is clinically characterized by hypotonia, severe intellectual disability and ASD. There is evidence that neurodegeneration of the central and peripheral nervous system occurs in some cases, which may begin in childhood, thus justifying the importance of characterizing neural cells from patients. IHPRF3 neurons showed changes in morphology and expression of genes related to neurodevelopment, confirming the importance of *TBCK* for cortical development. Despite the great genetic heterogeneity observed among ASD cases, a significant proportion of ASD-related genes have been shown to converge into specific molecular and biological pathways, and delineating the phenotypic effects caused by mutations in different genes contributes to the search for such altered pathways common to various ASD cases. Therefore, the clinical, molecular and

functional characterization of ASD-associated syndromes such as PMS and IHPRF3 aids in elucidating the pathophysiology of ASD as a whole.

LISTA DE SIGLAS

ACMG: Colégio Americano de Genética Médica

Array-CGH: Hibridização do genoma comparativo baseado em microarray

CARS: Escala de avaliação do autismo na infância

CEGH-CEL: Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células-Tronco

CID-10: Classificação Internacional de Doenças

CMA: Análise cromossômica por microarray

CNVs: Variações no número de cópias

DI: Deficiência Intelectual

DSM-5: Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria

FISH: Hibridização fluorescente in situ

FXS: Síndrome de X-Frágil

IB-USP: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

IHPRF3: Hipotonia congênita com retardo psicomotor e características faciais - Tipo 3

iPSC: Células tronco pluripotentes induzidas

MEFs: Fibroblastos embrionários murinos

MLPA: Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação

mRNA: RNA mensageiro

NPC: Células progenitoras neurais

NSC: Células tronco neurais

PBMCs: Células mononucleares do sangue periférico

PMS: Síndrome de Phelan-McDermid

qPCR: Reação da cadeia polimerase quantitativa em tempo real

RGPs: Progenitoras radiais da glia

rLOF: Variantes de perda de função raras

SD: Desvio padrão

SFARI: Simons Foundation Autism Research Initiative

SNC: Sistema nervoso central

SNP-array: Análise de polimorfismo de nucleotídeo único por microarray

SNVs: Variações de um único nucleotídeo

TEA: Transtorno do Espectro Autista

TDAH: Déficit de atenção e transtorno de hiperatividade

UNIFESP: Universidade federal de São Paulo

UTR: Região não-traduzida

VOUS: Variante de significado incerto

SUMÁRIO

Capítulo 1: Introdução geral e objetivos 15

O Transtorno do Espectro Autista: definição, epidemiologia e diagnósticos 15

Arquitetura genética do TEA 16

Contribuição de novas síndromes na elucidação do TEA 19

Síndrome de Phelan-McDermid 21

Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Características Facias – Tipo 3 23

Objetivos gerais e específicos 27

Capítulo 2: A Brazilian cohort of individuals with Phelan-McDermid syndrome: genotype-Phenotype correlation and identification of an atypical case 35

Capítulo 3: Modelagem *in vitro* de neurônios de pacientes com mutações em *TBCK* utilizando iPSC 68

Capítulo 4: Discussão geral e principais conclusões 101

Anexos 104

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

O Transtorno do Espectro Autista: definição, epidemiologia e diagnósticos.

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) caracteriza-se como um distúrbio neuropsiquiátrico complexo de início precoce. Há uma grande variabilidade nas expressões do quadro clínico, mas características comuns como isolamento social, interesses restritos, comportamentos estereotipados e repetitivos, estão sempre presentes (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* - 5th edition - DSM-5). Estima-se que o TEA afeta cerca de 1-2,4% da população mundial e é quatro vezes mais prevalente em homens do que em mulheres (Elsabbagh *et al*. 2012; Schaefer *et al.* 2013; Woodbury-Smith & Scherer 2018; Nakanishi *et al.* 2019).

O fenótipo do TEA é extremamente heterogêneo, e os critérios utilizados atualmente para diagnosticar o autismo são aqueles descritos na Classificação Internacional de Doenças (CID-10) e no Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-5). O diagnóstico clínico é estabelecido geralmente nos três primeiros anos de idade, e baseia-se principalmente em observações comportamentais (Betancur 2011; Griesi-Oliveira & Sertié 2017; Sharma *et al*. 2018). No entanto, a descrição do quadro pode ser dificultada por diversos fatores, como a ocorrência de comorbidades e a sobreposição de sintomas com outras condições (de la Torre-Ubieta *et al*. 2016; Sharma *et al*. 2018). Os sintomas do TEA raramente ocorrem de maneira isolada, e em 70% dos casos coexistem com outras comorbidades, como deficiência intelectual, déficit de atenção e transtorno de hiperatividade (TDAH), ansiedade, epilepsia, hipotonia e problemas imunológicos (Davis *et al*. 2011; Gargaro *et al*. 2011; Davis et al. 2011; Coury et al. 2012; ;; Mannion et al. 2013; Schaefer *et al*. 2013; Sztainberg & Zoghbi 2016).

Embora em alguns casos o autismo ocorra de maneira isolada, em outros o TEA pode estar associado a malformações e/ou características dismórficas, secundário a uma síndrome genética (Bourgeron, T. 2015; Fernandez & Scherer 2017), sendo denominado TEA sindrômico. Dentre as síndromes com forte associação ao TEA, destacam-se a síndrome do X-frágil, de Timothy, de Rett, bem como a esclerose tuberosa e a

neurofibromatose tipo 1, dentre outras (Bourgeron, 2012; Moreira *et al*., 2014; Fernandez & Scherer 2017).

Arquitetura Genética do TEA

Através de estudos epidemiológicos atualmente, sabe-se que a etiologia do TEA possui uma forte contribuição genética (Bourgeron 2016; Bourgeron 2015; Bai *et al.* 2019). Baseando-se em dados de taxa de concordância do TEA entre gêmeos monozigóticos (60-90%) e dizigóticos (0-30%), a taxa de herdabilidade tem sido estimada em 64 a 91% (Bourgeron 2015; Vorstman *et al*. 2017; Bai *et al.* 2019).

O padrão de herança do TEA, assim como as características clinicas, é extremamente heterogêneo (Figura 1). Como mencionado anteriormente, em alguns casos o TEA ocorre como uma característica secundária associada a uma síndrome genética. Na maioria destes casos o TEA sindrômico possui um padrão de herança mendeliano, onde uma única variante patogênica rara é suficiente para ocasionar o fenótipo (Sztainberg & Zoghbi 2016; Woodbury-Smith & Scherer 2018). O restante dos casos não-sindrômicos, ou também conhecido como autismo simples, estão associados a formas genéticas mais complexas que envolvem mais de uma variante patogênica. Inicialmente o modelo proposto para esta condição foi o multifatorial, onde variantes comuns (com frequência maior de 1% na população) de pequeno efeito em conjunto com fatores ambientais desencadeiam o TEA (Guo, Wang, *et al.* 2018). Estima-se que as variantes comuns estejam envolvidas na modulação do fenótipo de grande parte dos casos de autismo, porém os dados obtidos até o momento não foram conclusivos, visto que as variantes comuns individualmente possuem um baixo impacto e para estes tipos de estudo é necessário à análise de um número grande amostral (Grove *et al.* 2019).

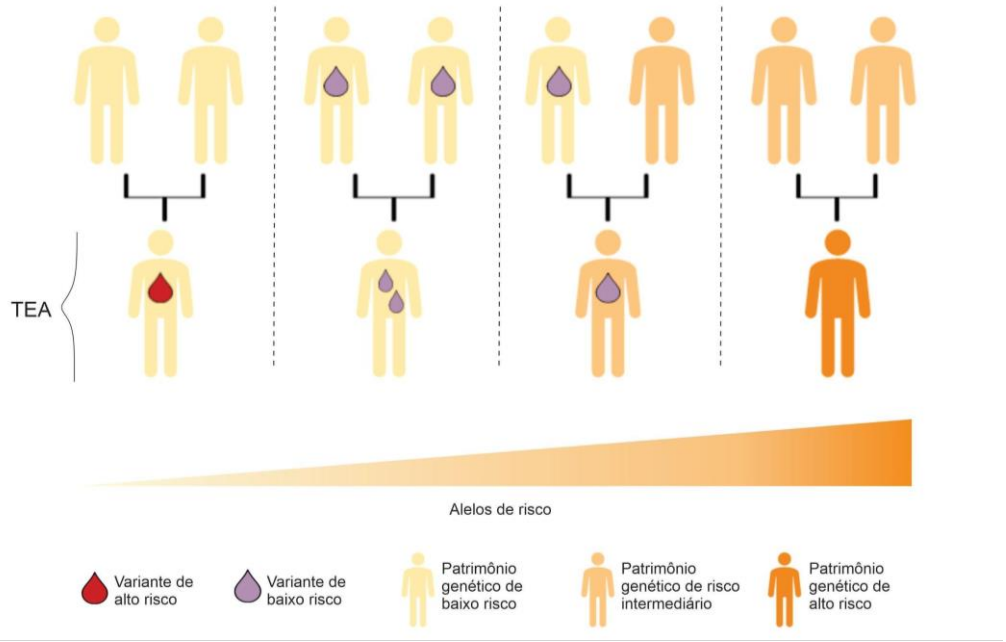


Figura 1. Arquitetura genética do TEA (Adaptado de Bourgeron *et al*. 2015). Variantes de alto, moderado e baixo risco podem contribuir para etiologia do autismo. (a) Há casos em que uma única variante rara de alto risco pode ocasionar o TEA, neste caso a mutação é do tipo *de novo* e não estava presente nos pais. (b) O TEA também pode manifestar em casos onde ambos os progenitores possuem variantes de risco moderado que podem ser herdadas pelo filho (modelo oligogênico). (c e d) Por fim, a criança pode vir a desenvolver o TEA, se os progenitores apresentarem número médio de variantes de baixo risco em conjunto a uma única variante de risco moderado, ou um grande número de variantes de baixo risco.

Os avanços recentes na área da genômica revolucionaram os conhecimentos existentes em relação a genética do autismo, pois demonstraram a importância das variantes patogênicas raras (presentes em menos de 1% da população geral) para o risco de TEA, que são em sua maioria do tipo *de novo*, privativas, mas podem também ser herdadas (Sanders *et al.* 2011; Ronemus *et al*. 2014; Sanders *et al.* 2015; Weiner *et al.* 2017). Tais variantes envolvem um amplo espectro de tipos de mutações, que vão desde alterações em um único par de base (SNVs) a perdas ou ganhos de milhares de pares de bases (CNVs) (Leblond *et al*., Weiner 2017; Nakanishi *et al.* 2019). No entanto, não se tem conhecimento se existe um número mínimo de variantes patogênicas por indivíduo afetado, sejam estas CNVs ou SNVs, ou ainda combinação de ambas. Com base nestes novos achados, o modelo de herança oligogênico, onde duas ou mais variantes genéticas patogênicas ocorrem em conjunto, tem sido proposto para uma parte dos casos de autismo (Du *et al.* 2019). Ainda, acredita-se que diferentes combinações ou o número destas variantes podem estar correlacionados com a gravidade do quadro clinico de TEA, explicando em parte a grande variabilidade clinica observada (Jensen & Girirajan 2017).

Portanto, estima-se que em conjunto as variantes raras *de novo* e herdadas explicam cerca de 10-30% dos casos de TEA (Vorstman *et al*. 2017; Woodbury-Smith & Scherer 2018; Rylaarsdam & Guemez-Gamboa 2019). Os estudos genômicos já levaram a identificação de mais de 1000 genes associados ao TEA, e há algumas iniciativas que tem organizado estes achados em plataformas digitais, um exemplo disto é o banco de dados SFARI (Simons Foundation Autism Research Initiative, https://www.sfari.org/) e o banco de dados MSSNG (https://www.mss.ng/about).

Apesar do grande número de genes candidatos ao TEA, tem-se verificado que uma parcela significativa dos genes já relacionados a estes transtornos convergem em algumas vias biológicas, incluindo remodelamento de cromatina, transcrição, tradução de proteínas, e plasticidade sináptica (Figura 2) (de la Torre-Ubieta *et al*. 2016; De Rubeis *et al.* 2014; Hansel 2019). Além dos estudos genômicos, há um grande investimento para compreender como as variantes genéticas estão relacionados ao fenótipo observado no TEA. Estes estudos têm sido priorizados principalmente em formas monogênicas de síndromes genéticas onde o autismo é prevalente. Desta forma, o progresso alcançado na compreensão da genética e dos mecanismos moleculares subjacentes à fisiopatologia do TEA sindrômico, apresentam um grande impacto no campo da neurogenética e tem fornecido novos conhecimentos, os quais abrem caminhos para terapias potenciais que podem ser relevantes inclusive para o autismo simples.

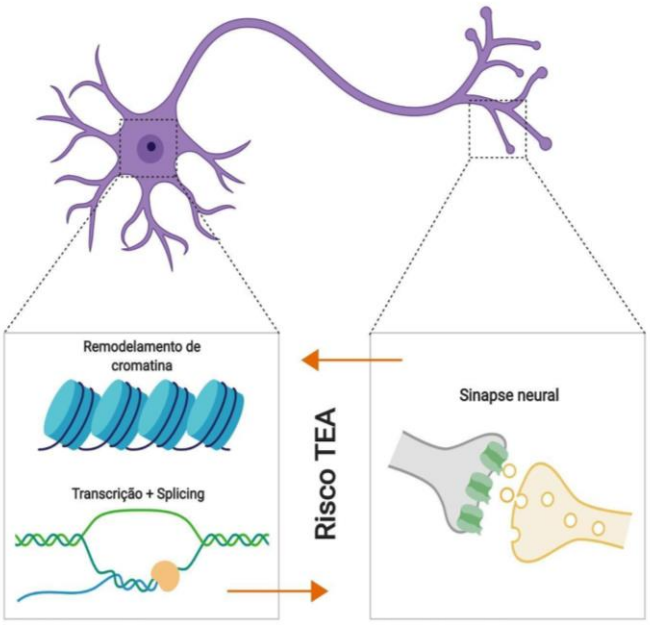


Figura 2. Mecanismos convergentes no TEA (Adaptado de Sullivan *et al.* 2019). As principais vias alteradas no autismo estão relacionadas ao processo de remodelamento de cromatina, transcrição e splicing, e a manutenção da transmissão sináptica. Além disso, os estudos recentes indicam que tais mecanismos interagem de uma certa forma, como mutações em genes que alteração o remodelamento de cromatina influencia no desenvolvimento de sinapses, e vice-versa.

Contribuição de novas síndromes na elucidação do TEA

Os estudos das formas sindrômicas do TEA contribuem para a elucidação de outras doenças neurológicas como Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), esquizofrenia e depressão, bem como podem auxiliar no entendimento de outras formas de autismo, particularmente dos casos não sindrômicos (Sztainberg & Zoghbi 2016; Fernandez & Scherer 2017). Um exemplo claro é a caracterização da fisiopatologia de mutações no gene *FMR1*, responsável pela síndrome de X-frágil. A FMRP, codificada pelo gene *FMR1*, é uma proteína de ligação ao RNA que regula a tradução, estabilidade e transporte de vários mRNAs que codificam proteínas essenciais para a manutenção da plasticidade sináptica. Através da investigação dos alvos da proteína FMRP e das vias de sinalização relacionadas a ela foi possível auxiliar na descoberta de novos genes associados ao TEA (Jansen *et al*. 2017; Fernández *et al*. 2013). Apesar das formas sindrômicas associadas ao TEA serem raras e individualmente não explicarem mais de 2% dos casos, de maneira conjunta estes quadros sindrômicos estão presentes em 10 a 20% dos indivíduos autistas (Fernandez & Scherer 2017; Rylaarsdam & Guemez-Gamboa 2019). Estima-se ainda que com o avanço

das novas tecnologias e métodos de sequenciamento este número aumente e, consequentemente, novos quadros sindrômicos e não sindrômicos sejam descritos.

Neste sentido, nos últimos 15 anos foram identificadas regiões cromossômicas que são mais frequentemente alteradas no TEA, como a região do 16p11.2, e variantes intragênicas em genes como *CHD8*, *ADNP*, *DYRK1* e *SHANK3* (Chen *et al*. 2015; Rylaarsdam & Guemez-Gamboa 2019). A caracterização clínica de indivíduos com autismo sindrômico e mesmo mecanismo genético, auxilia na identificação de sinais clínicos mais frequentes e contribui para um melhor diagnóstico. A síndrome da deleção e duplicação de 16p11.2 está presente em 0.9% dos casos de TEA, e caracteriza-se por atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, convulsões e macrocefalia (Moreira *et al.* 2014; Moreno-De-Luca *et al.* 2015; Sanders *et al*. 2015). O gene *CHD8* é um dos principais genes de risco para o TEA e encontra-se em 0,2% dos indivíduos, está localizado na região 14q11.2 e atua no processo de remodelamento de cromatina e regulador da via de sinalização Wnt. Indivíduos com mutações neste gene apresentam alguns dismorfismos e características típicas do autismo, além de deficiência intelectual e TDAH (MIM#615032) (Bernier *et al.* 2014). O fator de transcrição *ADNP*, está associado ao processo de diferenciação e maturação neural, e é responsável pela síndrome de Helsmoortel-van der Aa (MIM#611386). Recentemente mutações em *ADNP* foram encontradas em pacientes com deficiência intelectual e autismo e, estima-se que mutações neste gene estejam presentes em cerca de 0,17% dos casos de TEA) (Helsmoortel *et al*. 2014). *DYRK1A* é um membro da família de tirosina quinase e possui um papel muito importante na manutenção da proliferação celular e no desenvolvimento cerebral, e está presente em cerca 0,5% dos indivíduos com autismo. Localizado na região crítica do cromossomo 21 para a síndrome de Down (MIM#614104), *DYRK1A* é um dos genes candidatos para ser o principal responsável pelo déficit neurocognitivo associados à síndrome (Earl *et al*. 2017). Mutações no gene *SHANK3*, que correspondem a cerca de 0,5% dos casos de TEA, são responsáveis por ocasionar a síndrome de Phelan-McDermid (PMS) (Boccuto *et al.* 2013; Moreira *et al*. 2014). Além desses três genes e síndromes, gostaríamos de destacar a síndrome da Hipotonia Congênita com retardo psicomotor e características faciais do tipo 3 (IHPRF3), causada por mutações bialélicas em *TBCK*, que foi recentemente descrita e ainda não está completamente definido se o autismo é uma característica clínica dessa síndrome (Alazami *et al.* 2015; Bhoj *et al.* 2016; Chong *et al*. 2016; Ortiz-González *et al*. 2018). Dado que PMS e IHPRF3 são temas do presente estudo serão mais detalhadas a seguir.

A caracterização fenotípica em pacientes com mutações em regiões e genes associados ao TEA pode auxiliar na compreensão de diferentes perfis biológicos desta condição e elucidar as principais características ocasionadas pelos genes individualmente. Os dados clínicos mostram ainda que mutações no mesmo gene podem resultar em variabilidade fenotípica com uma ampla gama de apresentações clínicas. A variabilidade clínica nas formas dominantes pode ser atribuída à variação em (1) o tipo e impacto funcional da mutação, (2) a expressão do(s) alelo(s) remanescente(s), (3) outros loci que constituem o background genético e (4) exposições a fatores ambientais durante o curso da vida (Vorstman *et al.* 2017; Nakanishi *et al*. 2019).

Síndrome de Phelan-McDermid

A Síndrome de Phelan-McDermid (PMS), uma forma de TEA sindrômico, também conhecida como síndrome da deleção 22q13.3 (MIM#606232), é rara e caracteriza-se principalmente por atraso no desenvolvimento, déficit intelectual, atraso (ou ausência) da fala, hipotonia, autismo e dismorfismos faciais (Soorya *et al*., 2013). Em 2015, cerca de 600 casos de PMS foram descritos na literatura (Harony-Nicolas *et al.* 2015) e cerca de 1500 casos foram identificados pela Phelan-McDermid Syndrome Foundation (http://www.pmsf.org/).

Há uma ampla variabilidade clínica entre os pacientes com PMS e a prevalência de cada comorbidade pode variar dependendo do estudo (Sarasua *et al*., 2011, Soorya *et al*., 2013, Tabet *et al*, 2017). A PMS é ocasionada por alterações genéticas (deleções, translocações e mutações de ponto) que envolvem o gene *SHANK3.* As deleções variam de algumas centenas de kilobases a 9Mb (Bonaglia *et al.* 2011; Harony-Nicolas *et al.* 2015; Cochoy *et al.* 2015).

SHANK3 é expresso no córtex cerebral e no cerebelo, e é responsável por codificar uma proteína de mesmo nome que atua na formação, maturação e manutenção sináptica (Uchino e Waga 2013). Modelos *in vitro* de PMS utilizando células de pluripotência induzida (iPSC) de indivíduos afetados, já estão bem estabelecidos. O estudo realizado por Shcheglovitov *et al* 2013, demonstra que neurônios de indivíduos afetados possuem uma transmissão sináptica excitatória alterada, enquanto as inibitórias não foram prejudicadas. Além disso, mais recentemente Huang *et al*. 2019, utilizando a mesma técnica, demonstra que além de alterações morfológicas, como redução do tamanho do soma neural e

comprimento dos neuritos, os neurônios com mutações em *SHANK3* apresentaram uma disfunção eletrofisiológica na transmissão sináptica inibitória e excitatória e, ainda no mesmo estudo, as análises de transcriptoma revelaram que múltiplas vias biológicas relacionadas à projeção de neurônios, motilidade e regulação da neurogênese foram interrompidas.

Embora as mutações em *SHANK3* pareçam ser as principais responsáveis pelos sintomas neurológicos observados na síndrome, não são suficientes para explicar a grande variabilidade clínica encontrada (Qiu *et al.* 2018; Ziats *et al.* 2019). Os estudos existentes que buscam entender a relação entre o genótipo e fenótipo encontrado em PMS (Sarasua *et al.* 2011; Soorya *et al*. 2013; Sarasua *et al*. 2014; Tabet *et al.* 2017; De Rubeis *et al.* 2018; Mitz *et al.* 2018; Ziats *et al*. 2019), sugerem que deleções maiores tendem a estar associados a fenótipos mais graves, porém essa relação não é consistente para todas as comorbidades descritas na literatura, já que pacientes com deleções de tamanho semelhante podem ter fenótipos variáveis da doença. Acredita-se que outros genes presentes na região apresentem funções que podem ser relevantes para o desenvolvimento da síndrome, como aqueles associados ao desenvolvimento e organização do cerebelo e à via de sinalização sináptica glutamatérgica (Qiu *et al.* 2018; Mitz *et al.* 2018; Ziats *et al.* 2019).

A frequência do autismo em PSM varia de 50-90% (Sarasua *et al.* 2011; Soorya *et al.* 2013; Tabet *et al.* 2017; De Rubeis *et al.* 2018). Tal variação pode ser explicada de acordo com as características clínicas dos indivíduos da coorte utilizada, assim como a metodologia de análise adotada. De acordo com trabalhos descritos recentemente, a frequência do autismo seria inversamente proporcional ao tamanho da deleção, ou seja, quanto menor a deleção, mais frequente estaria o autismo. O menor número de casos de autismo em indivíduos com deleções maiores poderia ser explicado de acordo com a gravidade do quadro clinico da síndrome como um todo, visto que para estes a perda de comportamento adaptativo pode ocorrer no geral (Sarasua *et al.* 2014; Oberman *et al.* 2015; Ponson *et al*. 2018). Além disso, nos casos de alterações intragênicas (mutações pontuais) envolvendo *SHANK3* em uma coorte de indivíduos com PMS, o TEA permanece frequente (73%) e desta forma corrobora a associação do gene ao autismo (De Rubeis *et al.* 2018).

Até o momento, não há caracterização de pacientes brasileiros com PMS na literatura. Como tal síndrome é uma das mais comuns entre os pacientes com TEA (variando de 0,5% a 2%) (Kolevzon *et al.* 2014), entender a correlação genótipo-fenótipo e os mecanismos

moleculares subjacentes à PMS pode auxiliar na elucidação da etiologia do TEA, e impulsionar a descoberta e o desenvolvimento de novas terapias.

Hipotonia Congênita com Retardo Psicomotor e Características Faciais do tipo 3 - IHPRF3

A IHPRF3 foi inicialmente descrita em 2016, e conta com um total de 37 casos descritos no mundo até o momento. Clinicamente caracteriza-se, pela presença de deficiência intelectual, múltiplas malformações do sistema nervoso central, epilepsia, disfunções respiratórias, motoras e dismorfismos faciais (Chong *et al.* 2016; Guerreiro et al. 2016; Bhoj *et al.* 2016; Zapata-Aldana *et al.* 2019). O TEA até momento foi reportado em um único estudo (Bhoj *et al.* 2016). A IHPRF3 parece ser uma condição progressiva, com ampla variabilidade clínica, onde alguns casos vão a óbito nos primeiros anos de vida, enquanto outros pacientes apresentam mais de 20 anos de idade. Além disso, os pacientes podem apresentar um processo de neurodegeneração, onde não se sabe ao certo o período de início e nem o mecanismo, mas varia entre a infância e juventude (Beck-Wödl *et al.* 2018; Ortiz-González *et al.* 2018). Foi identificada pelo nosso grupo uma família com duas irmãs com transtornos do espectro autista, deficiência intelectual e atraso psicomotor, além de dismorfismos faciais (Moreira, 2017). Além da ampla variabilidade clínica presente, os sintomas descritos na IHPRF3 possuem sobreposição com outras síndromes, como a síndrome de Phelan-McDermid mencionada anteriormente, ocasionada pela haploinsuficiência do gene *SHANK3*, e a hipoplasia pontocerebelar, causada por mutações bialélicas no gene *TBC1D23*, o que acaba dificultando o diagnóstico que só é feito por meio do teste genético molecular.

A IHPRF3 é ocasionada por variantes bialélicas de perda de função em *TBCK*, com padrão de herança autossômico recessivo. O gene *TBCK* (TBC1 domain containing kinase) codifica uma proteína que contém três domínios funcionais: um domínio quinase, sucedido por um domínio TBC (Ter-2, Bub-2 e Cdc16) e um domínio rhodanase (RHOD) na porção C-terminal (Liu, Yan, & Zhou 2013). A função do *TBCK* ainda é desconhecida. Contudo, *TBCK* parece atuar na regulação da via mTOR e da autofagia, porém esses dados são insuficientes para se compreender a patofisiologia da doença (Liu *et al*., 2013; Bhoj *et al*., 2016; Moreira, 2017).

A via mTOR está relacionada a diversos processos celulares, e possui um papel importante na fisiologia e patologia cerebral a qual estaria alterada em alguns casos de autismo (Suzuki *et al.* 2015; Sánchez-Sánchez *et al.* 2018). No sistema nervoso, a via mTOR não só afeta a autofagia, o tamanho, sobrevivência, migração e proliferação celular (neurogênese) nos tecidos periféricos, mas também está envolvido em processos mais específicos, como brotamento e regeneração axonal, mielinização, expressão dos canais iônicos e crescimento dendrítico (Nicolini *et al*. 2015; Bockaert & Marin 2015; Crino 2015). Assim como a via mTOR, o conhecimento sobre o papel da autofagia no desenvolvimento neuronal continua crescendo, uma vez que inúmeras evidências mostram que a autofagia é fundamental para a integridade neural e o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (Liang 2019). Estudos recentes demonstram a importância da autofagia na formação das sinapses, a qual atua na regulação e refinamento das conexões sinápticas entres os neurônios e é um mecanismo candidato na regulação do equilíbrio entre excitação e inibição neuronal (Liang 2019). Perturbações na via autofágica estão associadas a doenças do neurodesenvolvimento como o autismo e doenças neurodegenerativas (Menzies *et al*. 2015; Chandrachud *et al*. 2015; Martini-Stoica *et al.* 2016; Adams *et al.* 2019).

Os experimentos realizados até o momento para a compreensão da função do gene *TBCK*, têm sido realizados em células não neurais (Ortiz-González *et al.* 2018; Bhoj *et al.* 2016; Liu *et al.* 2013), dificultando a correlação com os fenótipos do sistema nervoso o qual está bastante comprometido na IHPRF3. Diante da impossibilidade de acesso ao tecido nervoso de pacientes de interesse, as células tronco de pluripotência induzida (iPSCs) têm-se mostrado uma excelente ferramenta para o estudo de doenças de neurodesenvolvimento (Handel *et al.* 2016; Kang *et al.* 2017; Liu *et al*. 2017; Russo *et al*. 2019). A técnica descrita por Takahashi *et al* (2007) utiliza a superexpressão de genes específicos para reprogramar células somáticas em um estado pluripotente, gerando as iPSCs. A possibilidade de se obter células tronco a partir de tecidos diferenciados proporcionou uma revolução em relação ao conhecimento em diversas áreas básicas, assim como em áreas mais complexas como em terapias de reconstrução tecidual, fato que levou os proponentes dessa metodologia a receberem o prêmio Nobel de fisiologia e medicina em 2012. Desta forma, por meio do uso de iPSC é possível analisar etapas importantes do desenvolvimento do cérebro e as consequências de suas disfunções nas doenças do neurodesenvolvimento, sem as questões éticas do uso de linhagens embrionárias ou a durabilidade limitada das culturas primárias,

fornecendo modelos ilimitados *in vitro* do SNC para modelagem de doenças, mantendo ainda o patrimônio genético dos pacientes (Liu *et al.*, 2018) (Figura 3).

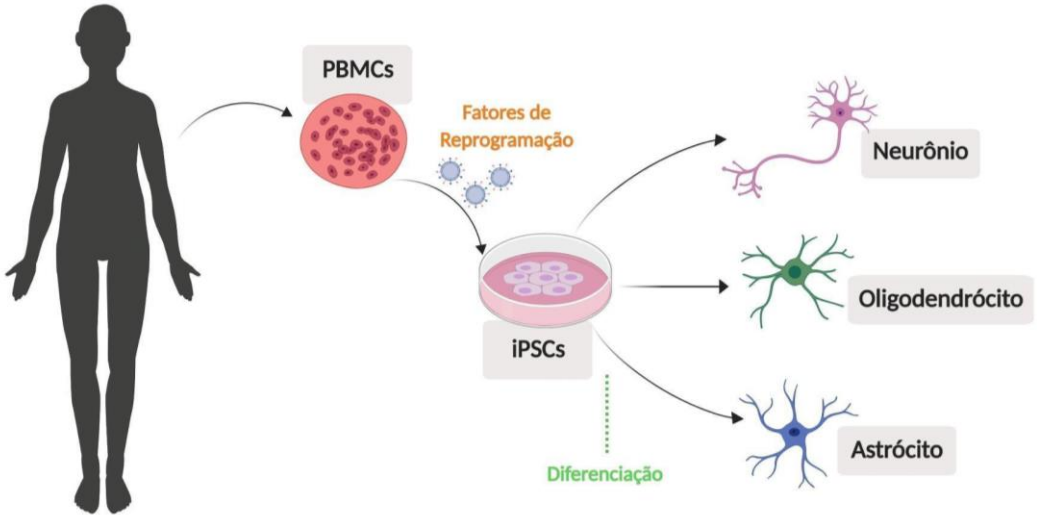


Figura 3. O uso da técnica de reprogramação para estudo de doenças do neurodesenvolvimento. Utilizando a técnica de reprogramação de células do sangue do paciente, é possível modelar doenças que afetam o desenvolvimento do cérebro *in vitro*. Através das iPSCs pode-se obter células de todo o sistema nervoso como os neurônios, oligodendrócitos e astrócitos.

Exemplos do sucesso do uso das iPSC para estudo de doenças do neurodesenvolvimento, foram realizados em condições associadas ao autismo como a síndrome de X-frágil, síndrome de Rett e mais recentemente em casos de TEA isolado (*TRPC6* e *FOXG1*). Os neurônios diferenciados a partir de iPSC de indivíduos com alguma destas condições apresentam de maneira geral alterações como: crescimento e manutenção de neuritos, número de espinhos dendríticos reduzidos, diminuição do soma neuronal, alterações eletrofisiológicas, e desequilíbrio entre sinapses inibitórias e excitatórias (Mariani *et al*. 2015; Griesi-Oliveira *et al.* 2015; Gomathi & Balachandar 2017; Telias 2019). Portanto, através destes trabalhos é possível demonstrar que a investigação de papéis de genes candidatos ao TEA no neurodesenvolvimento e na regulação de vias de sinalização pode auxiliar na compreensão dos mecanismos por trás da etiologia do TEA.

Os dados preliminares do nosso laboratório sugerem que células progenitoras neurais (NPC), derivadas de iPSC obtidas a partir de células do sangue das pacientes com a síndrome IHPRF3, possuem desregulação da via de sinalização mTOR, e no processo de autofagia, o que pode indicar envolvimento de biossíntese de vesículas lisossômicas (Moreira, 2017). Neste sentido, visto que ainda se têm pouco conhecimento em relação a

IHPRF3 e a síndrome acomete principalmente células do sistema nervoso, considera-se importante elucidar os efeitos das variantes de perda de função bialélicas em *TBCK* na modulação dos fenótipos neuronais de pacientes afetados. Compreender o mecanismo fisiopatológico de tais mutações auxilia na busca por abordagens terapêuticas na IHPRF3 assim como para outros casos de TEA.

Objetivos gerais

O presente estudo possui dois objetivos gerais:

1) Contribuir para uma melhor caracterização clinica e molecular de pacientes brasileiros com PMS;

2) Compreender os mecanismos patofisiológicos da deficiência de TBCK em células neuronais.

Objetivos específicos

Em relação ao objetivo 1, propusemos os seguintes objetivos específicos:

a) Estudar a correlação do genótipo e fenótipo de indivíduos com PMS;

b) Verificar se outros CNVs além daquelas localizadas em 22q13.3 podem contribuir para a variabilidade clínica da PMS;

c) Estimar a frequência de deleção em 22q13.3 entre indivíduos diagnosticados como TEA e em indivíduos com deficiência intelectual.

Em relação ao objetivo 2, propusemos os seguintes objetivos específicos:

a) Investigar o papel de *TBCK* no desenvolvimento neuronal em neurônios corticais;

b) Realizar análise dos principais marcadores do desenvolvimento neurnal em células neuronais de afetados com deficiência de TBCK

Bibliografia

Adams, J., Feuerborn, M., Molina, J.A., et al. 2019. Autophagy-lysosome pathway alterations and alpha-synuclein up-regulation in the subtype of neuronal ceroid lipofuscinosis, CLN5 disease. *Scientific reports* 9(1), p. 151.

Alazami, A.M., Patel, N., Shamseldin, H.E., et al. 2015. Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell reports* 10(2), pp. 148–161.

Bai, D., Yip, B.H.K., Windham, G.C., et al. 2019. Association of Genetic and Environmental Factors With Autism in a 5-Country Cohort. *JAMA psychiatry*.

Beck-Wödl, S., Harzer, K., Sturm, M., et al. 2018. Homozygous TBC1 domain-containing kinase (TBCK) mutation causes a novel lysosomal storage disease - a new type of neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN15)? *Acta neuropathologica communications* 6(1), p. 145.

Bernier, R., Golzio, C., Xiong, B., et al. 2014. Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell* 158(2), pp. 263–276.

Betancur, C. 2011. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Research* 1380, pp. 42–77.

Bhoj, E.J., Li, D., Harr, M., et al. 2016. Mutations in TBCK, Encoding TBC1-Domain-Containing Kinase, Lead to a Recognizable Syndrome of Intellectual Disability and Hypotonia. *American Journal of Human Genetics* 98(4), pp. 782–788.

Boccuto, L., Lauri, M., Sarasua, S.M., et al. 2013. Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *European Journal of Human Genetics* 21(3), pp. 310–316.

Bockaert, J. and Marin, P. 2015. mTOR in Brain Physiology and Pathologies. *Physiological Reviews* 95(4), pp. 1157–1187.

Bonaglia, M.C., Giorda, R., Beri, S., et al. 2011. Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with Phelan/McDermid syndrome. *PLoS Genetics* 7(7), p. e1002173.

Bourgeron, T. 2016. Current knowledge on the genetics of autism and propositions for future research. *Comptes Rendus Biologies* 339(7-8), pp. 300–307.

Bourgeron, T. 2015. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews. Neuroscience* 16(9), pp. 551–563.

C Yuen, R.K., Merico, D., Bookman, M., et al. 2017. Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience* 20(4), pp. 602–611.

Chandrachud, U., Walker, M.W., Simas, A.M., et al. 2015. Unbiased Cell-based Screening in a Neuronal Cell Model of Batten Disease Highlights an Interaction between Ca2+ Homeostasis, Autophagy, and CLN3 Protein Function. *The Journal of Biological Chemistry* 290(23), pp. 14361–14380.

Chen, J.A., Peñagarikano, O., Belgard, T.G., Swarup, V. and Geschwind, D.H. 2015. The emerging picture of autism spectrum disorder: genetics and pathology. *Annual review of pathology* 10, pp. 111–144.

Chong, J.X., Caputo, V., Phelps, I.G., et al. 2016. Recessive Inactivating Mutations in TBCK, Encoding a Rab GTPase-Activating Protein, Cause Severe Infantile Syndromic Encephalopathy. *American Journal of Human Genetics* 98(4), pp. 772–781.

Cochoy, D.M., Kolevzon, A., Kajiwara, Y., et al. 2015. Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID. *Molecular autism* 6, p. 23.

Crino, P.B. 2015. mTOR signaling in epilepsy: insights from malformations of cortical development. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5(4).

Davis, T.E., Hess, J.A., Moree, B.N., et al. 2011. Anxiety symptoms across the lifespan in people diagnosed with Autistic Disorder. *Research in autism spectrum disorders* 5(1), pp. 112–118.

de la Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J.L. and Geschwind, D.H. 2016. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nature Medicine* 22(4), pp. 345–361.

Du, Y., Li, Z., Liu, Z., et al. 2019. Nonrandom occurrence of multiple de novo coding mutations in a proband indicates the existence of an oligogenic model in autism. *Genetics in Medicine*.

Earl, R.K., Turner, T.N., Mefford, H.C., et al. 2017. Clinical phenotype of ASD-associated DYRK1A haploinsufficiency. *Molecular autism* 8, p. 54.

Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y.-J., et al. 2012. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 5(3), pp. 160–179.

Fernandez, B.A. and Scherer, S.W. 2017. Syndromic autism spectrum disorders: moving from a clinically defined to a molecularly defined approach. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 19(4), pp. 353–371.

Fernández, E., Rajan, N. and Bagni, C. 2013. The FMRP regulon: from targets to disease convergence. *Frontiers in Neuroscience* 7, p. 191.

Gomathi, M. and Balachandar, V. 2017. Novel therapeutic approaches: Rett syndrome and human induced pluripotent stem cell technology. *Stem cell investigation* 4, p. 20.

Griesi-Oliveira, K., Acab, A., Gupta, A.R., et al. 2015. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Molecular Psychiatry* 20(11), pp. 1350–1365.

Griesi-Oliveira, K. and Sertié, A.L. 2017. Autism spectrum disorders: an updated guide for genetic counseling. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)* 15(2), pp. 233–238.

Grove, J., Ripke, S., Als, T.D., et al. 2019. Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. *Nature Genetics* 51(3), pp. 431–444.

Guerreiro, R.J., Brown, R., Dian, D., de Goede, C., Bras, J. and Mole, S.E. 2016. Mutation of TBCK causes a rare recessive developmental disorder. *Neurology. Genetics* 2(3), p. e76.

Guo, H., Duyzend, M.H., Coe, B.P., et al. 2018. Genome sequencing identifies multiple deleterious variants in autism patients with more severe phenotypes. *Genetics in Medicine*.

Guo, H., Wang, T., Wu, H., et al. 2018. Inherited and multiple de novo mutations in autism/developmental delay risk genes suggest a multifactorial model. *Molecular autism* 9, p. 64.

Handel, A.E., Chintawar, S., Lalic, T., et al. 2016. Assessing similarity to primary tissue and cortical layer identity in induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons through single-cell transcriptomics. *Human Molecular Genetics* 25(5), pp. 989–1000.

Hansel, C. 2019. Deregulation of synaptic plasticity in autism. *Neuroscience Letters* 688, pp. 58–61.

Harony-Nicolas, H., De Rubeis, S., Kolevzon, A. and Buxbaum, J.D. 2015. Phelan mcdermid syndrome: from genetic discoveries to animal models and treatment. *Journal of Child Neurology* 30(14), pp. 1861–1870.

Helsmoortel, C., Vulto-van Silfhout, A.T., Coe, B.P., et al. 2014. A SWI/SNF-related autism syndrome caused by de novo mutations in ADNP. *Nature Genetics* 46(4), pp. 380–384.

Hoang, N., Cytrynbaum, C. and Scherer, S.W. 2018. Communicating complex genomic information: A counselling approach derived from research experience with Autism Spectrum Disorder. *Patient Education and Counseling* 101(2), pp. 352–361.

Jansen, A., Dieleman, G.C., Smit, A.B., et al. 2017. Gene-set analysis shows association between FMRP targets and autism spectrum disorder. *European Journal of Human Genetics* 25(7), pp. 863–868.

Jensen, M. and Girirajan, S. 2017. Mapping a shared genetic basis for neurodevelopmental disorders. *Genome Medicine* 9(1), p. 109.

Kang, S., Chen, X., Gong, S., et al. 2017. Characteristic analyses of a neural differentiation model from iPSC-derived neuron according to morphology, physiology, and global gene expression pattern. *Scientific reports* 7(1), p. 12233.

Liang, Y. 2019. Emerging concepts and functions of autophagy as a regulator of synaptic components and plasticity. *Cells* 8(1).

Liu, X., Campanac, E., Cheung, H.-H., et al. 2017. Idiopathic Autism: Cellular and Molecular Phenotypes in Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons. *Molecular Neurobiology* 54(6), pp. 4507–4523.

Liu, Y., Yan, X. and Zhou, T. 2013. TBCK influences cell proliferation, cell size and mTOR signaling pathway. *Plos One* 8(8), p. e71349.

Marchetto, M.C., Belinson, H., Tian, Y., et al. 2017. Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Molecular Psychiatry* 22(6), pp. 820–835.

Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., et al. 2015. FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell* 162(2), pp. 375–390.

Martini-Stoica, H., Xu, Y., Ballabio, A. and Zheng, H. 2016. The Autophagy-Lysosomal Pathway in Neurodegeneration: A TFEB Perspective. *Trends in Neurosciences* 39(4), pp. 221–234.

Menzies, F.M., Fleming, A. and Rubinsztein, D.C. 2015. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews. Neuroscience* 16(6), pp. 345–357.

Mitz, A.R., Philyaw, T.J., Boccuto, L., et al. 2018. Identification of 22q13 genes most likely to contribute to Phelan McDermid syndrome. *European Journal of Human Genetics* 26(3), pp. 293–302.

Moreira, D.P., Griesi-Oliveira, K., Bossolani-Martins, A.L., et al. 2014. Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy. *Plos One* 9(9), p. e107705.

Moreira, D. P. 2016. Múltiplas abordagens para determinar os fatores genéticos que contribuem para o ASD. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/T.41.2017.tde-18102017-151418. Recuperado em 2019-09-05, de www.teses.usp.br

Moreno-De-Luca, A., Evans, D.W., Boomer, K.B., et al. 2015. The role of parental cognitive, behavioral, and motor profiles in clinical variability in individuals with chromosome 16p11.2 deletions. *JAMA psychiatry* 72(2), pp. 119–126.

Nakanishi, M., Anderson, M.P. and Takumi, T. 2019. Recent genetic and functional insights in autism spectrum disorder. *Current Opinion in Neurology* 32(4), pp. 627–634.

Nicolini, C., Ahn, Y., Michalski, B., Rho, J.M. and Fahnestock, M. 2015. Decreased mTOR signaling pathway in human idiopathic autism and in rats exposed to valproic acid. *Acta neuropathologica communications* 3, p. 3.

Oberman, L.M., Boccuto, L., Cascio, L., Sarasua, S. and Kaufmann, W.E. 2015. Autism spectrum disorder in Phelan-McDermid syndrome: initial characterization and genotype-phenotype correlations. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 10, p. 105.

Ortiz-González, X.R., Tintos-Hernández, J.A., Keller, K., et al. 2018. Homozygous boricua TBCK mutation causes neurodegeneration and aberrant autophagy. *Annals of Neurology* 83(1), pp. 153–165.

Ponson, L., Gomot, M., Blanc, R., et al. 2018. 22q13 deletion syndrome: communication disorder or autism? Evidence from a specific clinical and neurophysiological phenotype. *Translational psychiatry* 8(1), p. 146.

Qiu, S., Li, Yan, Li, Yong, et al. 2018. Association between SHANK3 polymorphisms and susceptibility to autism spectrum disorder. *Gene* 651, pp. 100–105.

Ronemus, M., Iossifov, I., Levy, D. and Wigler, M. 2014. The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders. *Nature Reviews. Genetics* 15(2), pp. 133–141.

De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A.P., et al. 2014. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 515(7526), pp. 209–215.

De Rubeis, S., Siper, P.M., Durkin, A., et al. 2018. Delineation of the genetic and clinical spectrum of Phelan-McDermid syndrome caused by SHANK3 point mutations. *Molecular autism* 9, p. 31.

Russo, F.B., Brito, A., de Freitas, A.M., Castanha, A., Freitas, B.C. and Beltrão-Braga, P.C.B. 2019. The use of iPSC technology for modeling Autism Spectrum Disorders. *Neurobiology of Disease*, p. 104483.

Rylaarsdam, L. and Guemez-Gamboa, A. 2019. Genetic causes and modifiers of autism spectrum disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13.

Sánchez-Sánchez, S.M., Magdalon, J., Griesi-Oliveira, K., et al. 2018. Rare RELN variants affect Reelin-DAB1 signal transduction in autism spectrum disorder. Human Mutation 39(10), pp. 1372–1383.

Sanders, S.J., Ercan-Sencicek, A.G., Hus, V., et al. 2011. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron* 70(5), pp. 863–885.

Sanders, S.J., He, X., Willsey, A.J., et al. 2015. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* 87(6), pp. 1215–1233.

Sarasua, S.M., Boccuto, L., Sharp, J.L., et al. 2014. Clinical and genomic evaluation of 201 patients with Phelan-McDermid syndrome. *Human Genetics* 133(7), pp. 847–859.

Sarasua, S.M., Dwivedi, A., Boccuto, L., et al. 2011. Association between deletion size and important phenotypes expands the genomic region of interest in Phelan-McDermid syndrome (22q13 deletion syndrome). *Journal of Medical Genetics* 48(11), pp. 761–766.

Schaefer, G.B., Mendelsohn, N.J. and Professional Practice and Guidelines Committee 2013. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genetics in Medicine* 15(5), pp. 399–407.

Sharma, S.R., Gonda, X. and Tarazi, F.I. 2018. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 190, pp. 91–104.

Soorya, L., Kolevzon, A., Zweifach, J., et al. 2013. Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency. *Molecular autism* 4(1), p. 18.

Suzuki AM, Griesi-Oliveira K, de Oliveira Freitas Machado C, Vadasz E, Zachi EC, et al. 2015 Altered mTORC1 signaling in multipotent stem cells from nearly 25% of patients with nonsyndromic autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry* 20(5):551–2. doi: 10.1038/mp.2014.175

Sztainberg, Y. and Zoghbi, H.Y. 2016. Lessons learned from studying syndromic autism spectrum disorders. *Nature Neuroscience* 19(11), pp. 1408–1417.

Tabet, A.-C., Rolland, T., Ducloy, M., et al. 2017. A framework to identify contributing genes in patients with Phelan-McDermid syndrome. *npj Genomic Medicine* 2, p. 32.

Takahashi, K. et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861–872.

Telias, M. 2019. Molecular mechanisms of synaptic dysregulation in fragile X syndrome and autism spectrum disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12, p. 51.

Vorstman, J.A.S., Parr, J.R., Moreno-De-Luca, D., Anney, R.J.L., Nurnberger, J.I. and Hallmayer, J.F. 2017. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. *Nature Reviews. Genetics* 18(6), pp. 362–376.

Weiner, D.J., Wigdor, E.M., Ripke, S., et al. 2017. Polygenic transmission disequilibrium confirms that common and rare variation act additively to create risk for autism spectrum disorders. *Nature Genetics* 49(7), pp. 978–985.

Woodbury-Smith, M. and Scherer, S.W. 2018. Progress in the genetics of autism spectrum disorder. *Developmental Medicine and Child Neurology* 60(5), pp. 445–451.

Zapata-Aldana, E., Kim, D.D., Remtulla, S., Prasad, C., Nguyen, C.-T. and Campbell, C. 2019. Further delineation of TBCK - Infantile hypotonia with psychomotor retardation and characteristic facies type 3. *European Journal of Medical Genetics* 62(4), pp. 273–277.

Ziats, C.A., Grosvenor, L.P., Sarasua, S.M., et al. 2019. Functional genomics analysis of Phelan-McDermid syndrome 22q13 region during human neurodevelopment. *Plos One* 14(3), p. e0213921.

CAPÍTULO 2

A Brazilian cohort of individuals with Phelan-McDermid Syndrome: genotype-phenotype correlation and identification of an atypical case

Claudia Ismania Samogy-Costa[1], Elisa Varella-Branco[1*], Frederico Monfardini[1], Helen Ferraz[2], Rodrigo Ambrósio Fock[3], Ricardo Henrique Almeida Barbosa[3], André Luiz Santos Pessoa[4], Ana Beatriz Alvarez Perez[3], Naila Lourenço[1], Maria Vibranovski[1], Ana Krepischi[1], Carla Rosenberg[1], Maria Rita Passos-Bueno[1].*

[1]Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco (CEGH-CEL), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brazil

[2]Programa de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

[3]Centro de Genética Médica, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brazil.

[4]Ambulatório de Neurogenética, Hospital Albert Sabin, Brazil

[5]Faculdade de Medicina, Universidade Estadual do Ceará, UECE, Brazil

(*) These authors contributed equally to this work

This chapter was published in Journal of Neurodevelopmental disorders online in July 2019: https://doi.org/10.1186/s11689-019-9273-1

ABSTRACT

Background

Phelan-McDermid syndrome (PMS) is a rare genetic disorder characterized by global developmental delay, intellectual disability (ID), autism spectrum disorder (ASD) and mild dysmorphisms associated with several comorbidities caused by *SHANK3* loss-of-function mutations. Although *SHANK3* haploinsufficiency has been associated with the major neurological symptoms of PMS, it cannot explain the clinical variability seen among individuals. Our goals were to characterize a Brazilian cohort of PMS individuals, explore the genotype-phenotype correlation underlying this syndrome and describe an atypical individual with mild phenotype.

Methodology

A total of 34 PMS individuals were clinically and genetically evaluated. Data were obtained by a questionnaire answered by parents, and dysmorphic features were assessed via photographic evaluation. We analyzed 22q13.3 deletions and other potentially pathogenic copy number variants (CNVs) and also performed genotype-phenotype correlation analysis to determine whether comorbidities, speech status and ASD correlate to deletion size. Finally, a Brazilian cohort of 829 ASD individuals and another independent cohort of 2297 ID individuals was used to determine the frequency of PMS in these disorders.

Results

Our data showed that 21% (6/29) of the PMS individuals presented an additional rare CNV, which may contribute to clinical variability in PMS. Increased pain tolerance (80%), hypotonia (85%) and sparse eyebrows (80%) were prominent clinical features. An atypical case diagnosed with PMS at 18 years old and IQ within the normal range is here described. Among Brazilian ASD or ID individuals referred to CNV analyses, the frequency of 22q13.3 deletion was 0.6% (5/829) and 0.61% (15/2297), respectively. Finally, renal abnormalities, lymphedema and language impairment were found to be positively associated with deletion sizes, and the minimum deletion to cause these abnormalities is here suggested.

Conclusions

This is the first work describing a cohort of Brazilian individuals with PMS. Our results confirm the impact of 22q13 deletions on ASD and several comorbidities, such as hypotonia. The estimation of a minimal deletion size for developing lymphedema and renal problem can assist prediction of prognosis in PMS individuals, particularly those diagnosed in early infancy. We also identified one atypical individual carrying *SHANK3* deletion, suggesting that resilience to such mutations occurs. This case expands the clinical spectrum of variability in PMS and opens perspectives to identify protective mechanisms that can minimize the severity of this condition.

Key words: Phelan-McDermid syndrome, 22q13.3 deletion syndrome, autism spectrum disorder, *SHANK3*

RESUMO

Introdução

A síndrome de Phelan-McDermid é uma doença genética rara caracterizada por atraso no desenvolvimento global, deficiência intelectual (DI), transtorno do espectro autista (TEA) e dismorfismos leves associados a diversas comorbidades causadas por mutações de perda de função no *SHANK3*. Embora haploinsuficiência de *SHANK3* tem sido associada aos principais sintomas neurológicos da PMS, não é suficiente para explicar a variabilidade clínica observada entre os indivíduos. Nossos objetivos foram caracterizar uma coorte Brasileira de indivíduos com PMS, explorar a correlação genótipo-fenótipo subjacente a essa síndrome e descrever um indivíduo atípico com fenótipo leve.

Metodologia

Foram avaliados clinicamente e geneticamente um total de 34 indivíduos diagnosticados com PMS. Os dados foram obtidos por meio de questionários respondidos pelos pais, e as características dismórficas foram avaliadas por meio de fotografias. Foram analisadas deleções na região 22q13.3 e outras variantes estruturais (CNVs) potencialmente patogênicas em outras regiões, além disso, realizamos a análise de correlação genótipo-fenótipo para determinar se as comorbidades clínicas, o desenvolvimento da fala e TEA estariam relacionados ao tamanho da deleção. Por fim, uma coorte brasileira de 829 indivíduos com TEA e outra de 2297 indivíduos com DI foram utilizadas para determinar a frequência de PMS nestes transtornos.

Resultados

Nossos dados mostraram que 21% (6/29) dos indivíduos com PMS possuem uma CNV rara adicional, que pode estar contribuindo com a variabilidade clínica presente na síndrome. Características clínicas como tolerância a dor (80%), hipotonia (85%) e sobrancelhas esparsas (80%) foram as mais frequentes. Um indivíduo atípico diagnosticado com PMS aos 18 anos e nível de QI dentro do normal foi também descrito.

Dentre os indivíduos brasileiros com TEA ou DI, a frequência de deleção 22q13.3 foi de 0,6% (5/829) e 0,61% (15/2297), respectivamente. Finalmente, anormalidades renais, linfedema e atraso do desenvolvimento da fala mostraram-se positivamente associados aos

tamanhos das deleções, e a deleção mínima para causar essas anormalidades é aqui sugerida.

Conclusões

O presente estudo é o primeiro a descrever uma coorte de brasileiros com PMS. Os nossos resultados confirmam a importância das deleções do 22q13 no TEA e em diversas comorbidades, como a hipotonia. A estimativa de um tamanho mínimo de deleção para o desenvolvimento de linfedema e problemas renais pode auxiliar na previsão do prognóstico em indivíduos com PMS, principalmente aqueles diagnosticados no início da infância. Nós também identificamos um indivíduo atípico portador da deleção em *SHANK3*, sugerindo que alguns indivíduos podem apresentar uma certa resiliência na presença da deficiência de SHANK3. Casos como este expandem o espectro da variabilidade clínica nos pacientes de PMS, e abre novas perspectivas para identificação de mecanismos de proteção que possam minimizar a gravidade desta condição.

Palavras-chave: síndrome de Phelan-Mcdermid, síndrome da deleção do 22q13.3, Transtorno do Espectro Autista, *SHANK3*

Background

Phelan-McDermid syndrome (PMS) (OMIM #606232), or chromosome 22q13.3 deletion syndrome, is a rare genetic disorder that similarly affects males and females and shows considerable clinical heterogeneity (Boccuto *et al.* 2013). PMS is characterized by developmental delay, absent or delayed speech, intellectual disability (ID), frequent autistic features, seizures, renal, cardiac and gastrointestinal abnormalities, and mild dysmorphisms (Phelan & McDermid 2011; Bonaglia *et al*. 2011).

This syndrome results from *SHANK3* loss of function (or haploinsufficiency) mainly caused by deletions, whereas point mutations have also been described (Phelan & McDermid 2011; Bonaglia *et al*. 2011; Cochoy *et al.* 2015). Deletion size varies from a few kilobases to more than 9 Mb, and frequently includes a 22q terminal deletion (Bonaglia *et al*. 2011). *SHANK3* encodes an abundant brain protein involved in regulating postsynaptic density of glutamatergic synapses, playing a role in synaptic function by modulating dendrite formation (Monteiro & Feng 2017). *SHANK3* loss of function is one of the most frequently recurring alterations in autism spectrum disorder (ASD) and ID cohorts, with an estimated frequency at 0.5% to 2%, respectively (Boccuto *et al*. 2013).

SHANK3 haploinsufficiency is associated with the major neurological symptoms of PMS; however, it cannot explain the wide clinical variability among PMS cases (Tabet *et al*. 2017) and recent data suggest that additional genes encompassed by the deletion also contribute to phenotype expressivity (Mitz *et al*. 2018)**.** A number of genotype-phenotype correlation studies have been conducted, but there is no consensus among the results obtained (Tabet *et al*. 2017; Sarasua *et al*. 2011; Sarasua *et al.* 2014; Soorya *et al*. 2013; Dhar *et al*. 2010). Further studies exploring the molecular basis of PMS are needed for clarifying the genetic basis for the clinical variability in PMS.

Therefore, our main goal was to explore the genotype-phenotype correlation in a cohort of 34 Brazilian individuals with PMS, representing an ethnic admixture of European, African and Amerindian ancestries. We also estimated the frequency of PMS among Brazilian ASD individuals and in an independent Brazilian cohort of individuals with ID (associated or not with other clinical signs). This work expands the existing literature on PMS in different ethnicities, aiding in uncovering the etiology of its clinical variability.

Methods

Cohort

Thirty-four individuals with clinical and genetic diagnosis of PMS, members of the "Associação dos Amigos e Familiares da Síndrome de Phelan-McDermid - Brasil" (https://www.phelanmcdermidbrasil.com/), were included in this study. This cohort consisted of 16 males (47%) and 18 females (53%), with age ranging from 1.8 to 19.6 years old (mean = 7.54, SD= 3.86). Parents or guardians provided genetic exams and completed a standardized medical history questionnaire. The questionnaire included queries about the individuals' development, comorbidities, autism diagnosis, and genetic tests. In addition to that, 27 families also provided pictures of their affected children.

Two other independent cohorts were included in this study in order to estimate the frequency of 22q13.3 deletions in Brazilian ASD or ID individuals. An ASD cohort of 829 individuals [656 (79.1%) males and 173 (20.9%) females] was tested by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and ascertained at CEGH-CEL (Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células Tronco, Instituto de Biociências (IB), USP) between 2009-2017, with a diagnosis or diagnostic hypothesis of ASD. The other cohort consisted of 2297 individuals, mostly under 18 years old and were referred to chromosomal microarray testing for presenting ID, either associated or not with other clinical signs. These samples were tested by the Laboratório de Pesquisa em Genética Humana from the Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB, USP, from 2004 to 2018.

Parents or guardians of individuals from both cohorts signed a consent form. The study was approved by the Brazilian National Research Ethics Commission.

Clinical evaluation

Dysmorphology and comorbidity evaluation: Morphological and comorbidity evaluation was performed by analyzing the individuals' medical records and pictures, whenever available. Parents were asked to answer questions about comorbidities with three possible answers: "Yes" (if the individual has the comorbidity), "No" (if the individual does not have the comorbidity) and "I am not sure" (if the parents cannot answer). In some cases, such as "speech", the answer: "not applicable" for individuals aged less than three was

taken into account in our analyses. Any dubious or "not sure" answer was excluded. Moreover, three clinicians from the Departamento de Morfologia e Genética, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, independently evaluated pictures of the individuals in order to analyze their morphological features.

Genetic tests to detect copy number variation (CNV)

Molecular diagnosis of the 34 PMS individuals: All individuals have a deletion at 22q13.3 encompassing *SHANK3*. Different exams and platforms were applied: array-CGH (n = 15) or SNP array (n = 14) were performed in 29 individuals (see details in Table 1); fluorescent in situ hybridization (FISH) was performed in four individuals, and MLPA (SALSA MLPA kit P036-E2-0413 and P070-B3-0714 MRC Holland) was performed in one individual. All genetic tests were conducted by outsourced laboratories.

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) test in 829 ASD individuals: The SALSA MLPA kit P343 AUT (Cat. P343-100R, MRC Holland, Amsterdam, the Netherlands) was used, which may detect alterations in 15q11-q13, 16p11.2, and 22q13.3. The procedure was performed as previously reported (Moreira et al. 2014). The PCR products were detected by the ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, US), by using capillary electrophoresis and GeneMarker (Softgenetics) to analyze the raw data.

Array-CGH in the 2297 ID individuals: DNA sample of all individuals were submitted to CMA, by using different platforms, namely aCGH 60K and 180K, from Agilent Technologies (average probe spacing of 54.5Kb and 17.6Kb, respectively) as previously described (Krepischi *et al*. 2012).

CNV pathogenicity interpretation

Every CNV was characterized by type (deletion or duplication), size, gene content (based on RefSeq gene data available on the UCSC genome browser, using the hg19), allele population frequency (based on the Database of Genomic Variation Database - DGV), literature and clinical information about disease associated genes and inheritance (whenever possible). This information together with the International Standard Cytogenomic Array (ISCA) and the American College of Medical Genetic (ACMG) standards (Kearney *et al*.

2011) were taken into account to classify the CNVs into pathogenic, benign, or variant of uncertain clinical significance (VOUS).

ASD assessment

In total, 18 out of 34 individuals were evaluated by a specialist (neurologist, psychiatrist, or psychologist) for ASD. In addition to medical diagnosis, parents were asked to answer about autistic-like behavior or ASD, which considered the following autism symptoms: no-eye contact, repetitive behavior, lack of social interaction, difficulty in changing routines. The questionnaire presented four possible answers: (1) No, he/she has no autism symptoms; (2) No, a detailed assessment was made and autism was ruled out; (3) Yes, autism was diagnosed in an evaluation with a neurologist/psychologist/psychiatrist; (4) Yes, there has been no diagnosis but we know from his/her behavior.

Data analysis

Non-parametric test: Descriptive statistics were calculated across all measures into three different domains: comorbidities, ASD, and language status. Mann–Whitney U tests were conducted to explore potential associations between each medical comorbidity and ASD with deletion size. Kruskal-Wallis was performed to determine whether there was a correlation between language status and deletion size. The level of significance adopted was $P<0.05$.

Cluster analysis: Ward´s Hierarchical cluster analysis was performed using only the comorbidity variables in order to verify if individuals group according to their clinical features.

Results

Characterization of 22q13.3 deletions in PMS individuals

All individuals carry deletions affecting *SHANK3* (Table 1). Deletion size was estimated in 29 individuals tested by CMA; they carried terminal deletions with a mean size of 4.1 Mb (ranging from 0.049 Mb to 9.1 Mb) (Figure 1 and Table 1). Two of them showed mosaicism: one with an 8.3 Mb deletion (P4) and the other with an 8.8 Mb deletion (P25). Parental genetic testing was available for nine individuals and all deletions were *de novo*.

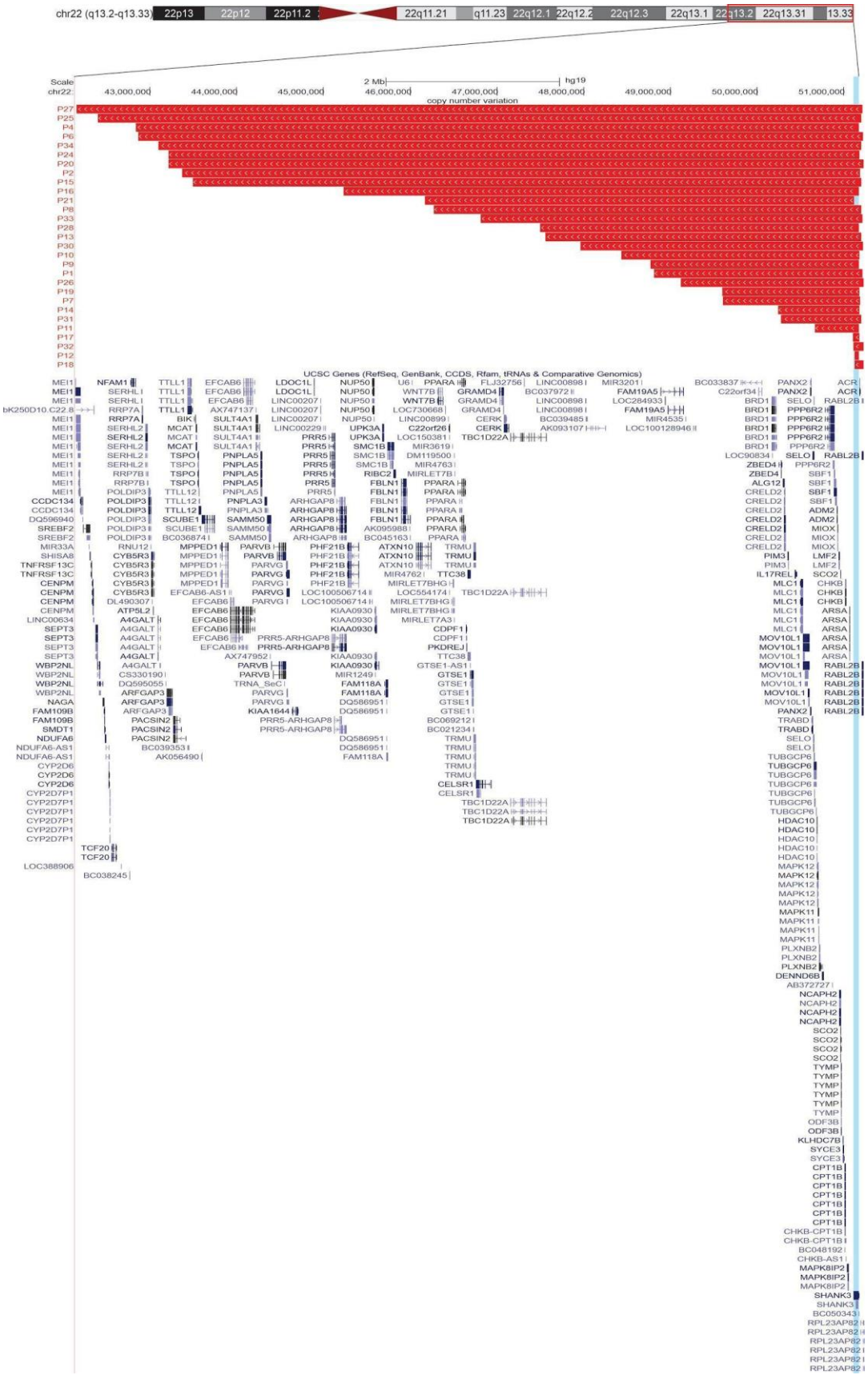


Figure 1. Distribution of terminal deletions among 29 PMS individuals that varied from 49 kb to 9.1 Mb.

Table 1. Details of the 22q13.3 deletions identified in 34 individuals with Phelan-McDermid syndrome.

ID	Gender	Copy number evaluation method	Rearrangement	Array coordinates (hg19[GRCh37])	Deletion size (Mb)	Genes	Inheritance
P1	F	SNP array*	Deletion	48810119-51211393	2.4	Many	NA
P2	F	aCGH 180K	Deletion	43371148-51186249	7.8	Many	NA
P3	F	FISH	Deletion	NA	NA	*SHANK3*	NA
P4	M	aCGH 180K	Deletion (mosaic)	42839080-51174293	8.3	Many	NA
P5	M	FISH	Deletion	NA	NA	*SHANK3*	NA
P6	M	aCGH 60K	Deletion	42865291-51219009	8.3	Many	De novo
P7	F	aCGH 180K	Deletion	49608334-51186249	1.5	Many	NA
P8	F	SNP array 750K	Deletion	46276401-51197766	4.9	Many	NA
P9	F	SNP array 400K	Deletion	48771374-51171678	2.4	Many	De novo
P10	F	aCGH*	Deletion	48434307-51178213	2.7	Many	De novo
P11	F	SNP array 400K	Deletion	50667787-51171678	0.5	Many	De novo
P12	M	SNP array 400K	Deletion	51122360-51171678	0.049	*SHANK3*	De novo
P13	M	SNP array 750K	Deletion	47557877-51197766	3.6	Many	NA
P14	M	aCGH*	Deletion	50241089-51178213	0.9	Many	NA
P15	M	SNP array 400K	Deletion	43492638-51197766	7.7	Many	NA
P16	M	SNP array 400K	Deletion	45235285-51171678	5.9	Many	De novo
P17	F	FISH	Deletion	51104247-51178574	0.074	*SHANK3*, *ACR*	NA
P18	F	aCGH 180K	Deletion	51123491-51224252	0.1	*SHANK3, ACR, RABL2B*	NA
P19	F	aCGH 44K	Deletion	49595567-51178405	1.5	Many	De novo
P20	F	aCGH 180K	Deletion	43213659-51224252	8.0	Many	NA
P21	F	SNP array 750K	Deletion	46168628–51115526	4.9	Many	NA
P22	M	MLPA	Deletion	NA	NA	*ARSA*, *SHANK3*	NA
P23	F	MLPA/FISH	Deletion	NA	NA	*SHANK3*	NA
P24	F	aCGH 60K	Deletion	43213481-51178354	7.9	Many	NA
P25	F	SNP array 750K	Deletion (mosaic)	42399686-51197766	8.79	Many	De novo
P26	M	aCGH 180K	Deletion	49123097-51224252	2.1	Many	NA
P27	M	SNP array 850K	Deletion	42152988-51211392	9.0	Many	NA
P28	F	SNP array 400K	Deletion	47497833-51171678	3.67	Many	De novo

P29	M	FISH	Deletion	NA	NA	*SHANK3*	NA
P30	M	aCGH 180K	Deletion	47963467-51219009	3.25	Many	NA
P31	M	SNP array 750K	Deletion	50274217-51197766	0.9	Many	NA
P32	M	aCGH 180K	Deletion	51123491-51224252	0.1	*SHANK3, ACR, RABL2B*	NA
P33	F	SNP array 850K	Deletion	46814671-51211392	4.39	Many	NA
P34	M	SNP array*	Deletion	43094876-51197838	8.1	Many	NA

*The outsourced laboratory did not specify the platform on the report.

Other genetic alterations in the Brazilian PMS cohort

We also identified additional rare CNVs (n=10) located in genomic regions other than 22q13.3 in six individuals (Table 2). Three out of 6 individuals carried terminal duplications varying in size from 0.4 Mb to 14.9 Mb, thus suggesting that the genomic imbalances resulted from the presence of a translocation derivative chromosome. The remaining three individuals had interstitial CNVs varying in size from 0.03 Mb to 14.8 Mb. All these additional CNVs encompass OMIM genes. Of these, two are associated with genomic alterations that clinically overlap PMS: 12q24 duplication (P4) and chromosome 16p13.3 duplication syndrome (P31); therefore, they were classified as pathogenic. Moreover, one CNV (P28) affects a gene associated with autosomal dominant non-insulin dependent diabetes mellitus. It was not possible to establish whether the remaining CNVs added to the clinical variability of these individuals, since they encompass regions with genes that were either not previously associated with disorders or associated with recessive disorders; therefore, they were classified as variants of unknown clinical significance (VOUS).

Table 2. Non-22q CNV findings in nine individuals with PMS.

ID	Additional genomic findings (hg19[GRCh37])	Size	Position	Genes	OMIM disease association
P4	Yq11.21q11.23(13872502-28644194)x0	14.8 Mb	Interstitial	32 protein-coding genes (USP9Y)	Spermatogenic failure, Y-linked, 2 SPGFY2 and Chromosome Yq11 interstitial deletion syndrome
	12q24.23q24.33(118841028-133773528)x3 (mosaic)	14.9 Mb	Terminal	103 protein-coding genes (18 morbid)	Many
P12	Xq28(148685454-148716519)x3	31 kb	Interstitial	*TMEM185A*	No OMIM disease association
P20	18p11.32(64847-464868)x3	400 kb	Terminal	*USP14, THOC1, COLEC12*	No OMIM disease association
	Xq28(148094899-148607966)x3	513 kb	Interstitial	*IDS*	Mucopolysaccharidosis II (XLR[a])
P21	22q13.31(44257185-45143609)x3 (mosaic)	886 kb	Interstitial	8 protein-coding genes (none morbid)	No OMIM disease association
	Xp22.33(7514750-8135644)x3	620.9 kb	Interstitial	*VCX, PNPLA4, MIR651*	No OMIM disease association
P28	15q21.3(58801559-58861468)x1	59.9 kb	Interstitial	*LIPC*	Hepatic lipase deficiency (AR[b]), [High density lipoprotein cholesterol level QTL 12], {Diabetes mellitus, non-insulin-dependent} (AD[c])
P31	11p14.3(23032300-24843680)x3	1.8 Mb	Interstitial	*LUZP2, MIR8054*	No OMIM disease association
	16p13.3(85880-3998442)x3	3.9 Mb	Terminal	158 protein-coding genes (28 morbid)	Chromosome 16p13.3 duplication syndrome

[a]X-linked recessive inheritance
[b]Autosomal Recessive Inheritance
[c]Autosomal Dominant Inheritance

Clinical findings in Brazilian cohort of PMS individuals

Several dysmorphisms were evaluated in 26 individuals (supplementary material Table S1). The most common morphological features (frequency >70%) were ear abnormalities, sparse eyebrows, large/fleshy hands and slender fingers. Regarding comorbidities, the most commonly reported were increased pain tolerance and hypotonia, occurring in 80% and 85% of the individuals, respectively (Table 3, supplementary material Table S2). In addition, 60% of individuals had a history of recurrent upper respiratory tract infections (Table 3). Other common conditions (frequency >50%) were gastroesophageal reflux disease and chewing difficulties (Table 3).

Table 3. Reported comorbidities in individuals with PMS in our cohort as compared to the literature

Comorbidity	N	Total	Present Study	Literature frequency[1]
Hypotonia	28	33	85%	29% - 100%
Increased pain tolerance	24	30	80%	10% -88%
Recurring upper respiratory tract infections	20	33	61%	8% - 53%
Chewing difficulties	19	33	58%	50%[2]
Gastroesophageal reflux	17	30	57%	>25% - 44%
Constipation and/or diarrhea	14	33	42%	38% - 41%
Sleep disturbance	13	33	39%	41% - 46%
Renal abnormalities	10	33	30%	17% - 38%
Seizures (febrile and/or non-febrile)	9	34	26%	14% - 41%
Precocious or delayed puberty	4	28	14%	0% - 12%
Lymphedema	4	30	13%	22% - 29%
Cardiac abnormalities	2	34	6%	3% -25%
Hearing loss	1	34	3%	NA[3]

[1]Frequencies based on the literature review available (Kolevzon et al. 2014). [2]Frequency available in the analysis of PMS individuals carrying *SHANK3* point mutations (De Rubeis et al. 2018). [3]Although the frequency of this comorbidity was not considered in this study, the literature describes some cases of PMS individuals presenting hearing loss (Fujita et al. 2000).

Development

All except one individual included in this study have developmental delay. We evaluated language and motor development based on the information the parents reported. For language status, we considered only individuals above 3 years old, who were classified into four different classes: speech absence, unintelligible speech (babbling), speaks a few words, and speak sentences. Eighty-four percent (21/25) of children showed unintelligible or absent speech, and only 3 children (3/25; 12%) speak sentences (P14, P30, and P32) and were respectively 9, 11 and 19 years old at the time of evaluation. Regarding motor development, 75% (25/33) of them walk, with a mean age of onset at 2.27 years old (SD= 0.84). The remaining 8 individuals did not walk at the time of evaluation (aged from 1.8 to 10).

Furthermore, individual P32 has a phenotype that differs from that of the other PMS individuals and is described in detail below.

Atypical individual in the Brazilian PMS cohort

Individual P32 is a twenty-year-old male diagnosed with PMS at the age of eighteen, when he failed a psychometric test when applying for a driver's license. His karyotype was normal. Array-CGH analysis revealed the deletion of 110 kb in one allele in 22q13.3, that partially encompasses *SHANK3* (from exon 10 toward its 3`end) and two other genes (*ACR* and *RABL2B*). The MLPA test in his parents confirmed that the CNV in P32 individual is a *de novo* mutation (Supplementary Figure S1). He is the only child of healthy non-consanguineous parents; her mother gave birth at the age of 26 by vaginal delivery at 40 weeks of gestation (Apgar scores 8/9, weight 3650 g, length 52 cm). Early development was characterized by neonatal hypotonia, and he had head control at eight months of age. He started speaking at the age of one and walked when he was 1 year and 8 months old. Literacy occurred on a regular basis and he attended regular elementary through high school programs, without the need for additional assistance. At the age of twenty, Wechsler Adult Intelligence Scale showed verbal, performance and full-scale IQ at 93, 99 and 96, respectively. The individual presents deficits in attention and in processing speed, in addition to difficulty in adjusting to social norms. He also presents mild phonemic impairment and some autistic-like features, such as difficulties related to making and keeping friendships, social and emotional responsiveness, processing figured speech, sensory sensitivity and the insistence on sticking to routine. In turn, executive functions, such as logical reasoning, abstraction and operational memory are preserved. Currently, he is in the seventh semester of studies towards getting his bachelor's degree in Computer Sciences at a private university. Clinical evaluation at the age of 20 showed dysmorphic features, such as elongated face, hypertelorism, prognathism, small and slightly bulbous nose and arched palate. Doppler echocardiography, electroneurography, magnetic resonance imaging (MRI) and electroencephalogram (EEG), abdominal and renal ultrasound and audiological evaluation were performed between 2015 and 2018 and showed normal results.

ASD in PMS

73.5% (25/34) of individuals presented autism. ASD was diagnosed by a specialist in 18 of them (ASD frequency: 13/18 or 72.2%), while the remaining 16 had the ASD diagnosis based on the questionnaire (ASD frequency: 12/16 or 75%).

Frequency of *SHANK3* copy number alterations in ASD and in other neurodevelopmental disorders

In a Brazilian cohort of 829 individuals with ASD diagnosis, we observed that five of them (all males) presented a 22q13.3 deletion (0.60%). In another cohort consisting of 2297 ID individuals, fifteen of them presented *SHANK3* deletions (0.61%).

Genotype-phenotype correlation

Twenty-nine individuals with CMA results were included for genotype-phenotype correlation analysis. A cluster hierarchical analysis was performed in order to determine similarities among groups of PMS individuals using comorbidity data and resulted in four groups that mainly differ in frequency and type of comorbidities (Figure 2; supplementary material Table S3). In this analysis, the degree of severity of each comorbidity was not considered. A positive relationship between the groups and the median of deletion size of their members was observed, but with a borderline p-value (P=0.05, Kruskal-Wallis test). Groups 2 and 4 presented the largest and smallest median deletion size, respectively. Group 4 consisted of individuals who were characterized by the absence of some comorbidities, such as lymphedema, renal abnormalities, gastroesophageal reflux, strabismus and sleep disturbance, which are clinical features that are present in some individuals from group 2. Once we tested the correlation between each comorbidity individually with the deletion size (Mann Whitney test), only renal abnormalities (p-value = 0.011) and lymphedema (p-value = 0.0480) had a significant correlation (supplementary material Table S4). The two individuals with additional pathogenic CNVs (P4 and P31) were clustered in the expected group according to their 22q13 deletion size, that is, P4 (deletion of 8.3 Mb) clustered to group 2 (largest deletion) and P31 (0.9 Mb) to group 4 (smallest median deletion).

We also tested the correlation of deletion size with language status and autistic features. The only three individuals that were able to speak full sentences (P14, P30, and P32) were in the group with the smallest mean deletion size (group 4), thus suggesting a correlation with deletion size, which was statistically confirmed (Kruskal-Wallis, p= 0.04). Finally, we did not find positive correlation between ASD and deletion size (Mann Whitney, p=0.38), nor between groups from the clustering analysis and ASD frequency (Chi-square = 0.2651).

In order to verify the smallest regions in 22q13.3 that were more likely associated with renal abnormalities, we analyzed 14 individuals from the literature (9,13,14) with deletions in the 22q13.3 region detected by CMA who presented renal abnormalities (supplementary material, Figure S2 and Table S5). The smallest deletion found was 1.3 Mb, as described by Tabet *et al*. (2017). We also determined the penetrance of renal abnormalities in individuals with deletions encompassing four candidate genes for renal abnormalities: *ZBED4*, *CELSR1*, *FBLN1* and *UPK3A*, by using data from 101 individuals *(*72 individuals from the literature in addition to our 29 individuals; supplementary material, Table S6). The penetrance observed for alterations encompassing only *ZBED4*, the closest gene to *SHANK3*, was 14.7%, while for the alterations encompassing *ZBED4* and *CELSR1* was 36.4%, and for alterations encompassing all four genes was 40.0%.

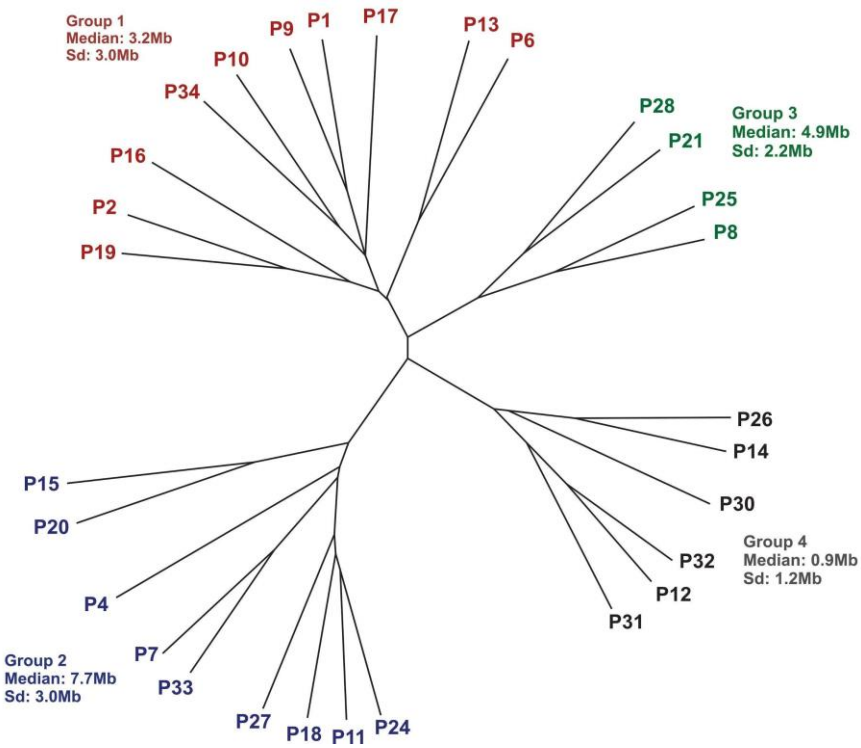


Figure 2. Hierarchical clustering dendrogram graphic showing the formation of four clusters of individuals according to their comorbidities. The range of deletion size is summarized for each group. Sd = Standard deviation.

Discussion

The present study conducted in 34 Brazilian PMS individuals confirmed the great heterogeneity in deletion size at 22q13.3 encompassing *SHANK3* and the relevance of *de novo* mutations to the origin of these deletions (Bonaglia *et al.* 2011). None of our patients harbor pathogenic point mutations in *SHANK3*, a less frequent cause of PMS (De Rubeis *et al.* 2018) detectable through sequence analysis, possibly due to diagnostic bias, as CNV analysis (by karyotype, MLPA and CMA) is the most accessible genomic test for our population.

Ten CNVs in addition to the 22q13.3 deletion were observed in six out of 29 individuals (21%). Three of them (10%) carry a terminal duplication, in accordance to previous estimates (Sarasua *et al.* 2011; Kolevzon *et al*. 2014) and possibly represent cases where one of the parents harbors a balanced chromosomal translocation. Among the other non-22q13.3 genetic alterations, the 16p13.3 duplication is associated with facial dysmorphisms, language impairment, delayed motor development and broad toes (Phelan & McDermid 2011; Fontes *et al.* 2016; Demeer *et al.* 2013), which are clinical features also present in our individual (P31). The 12q duplication leads to clinical features commonly seen in PMS, such as neurodevelopmental delay and dysmorphic features (Geckinli *et al.* 2015), and it may contribute to the severity of the phenotype of the PMS individual (P4). It is of note that these two individuals were clustered as expected by their *SHANK3* deletion size. Given the clinical overlap among these three genetic alterations, these results are expected, particularly since we only considered the presence/absence of comorbidities and not their severity in the cluster analysis. Nevertheless, it is possible that these additional non-22q13.3 hits have contributed to phenotype severity. Among the remaining non-22q13.3 CNVs, we would like to highlight an intragenic deletion encompassing *LIPC*, in which pathogenic variants lead susceptibility to form of non-insulin-dependent diabetes with late onset (OMIM#151670). This is not a common clinical feature of PMS individuals (Barakat *et al*. 2004), but this incidental finding could contribute to better manage the individual in adulthood.

The most common comorbidities in our cohort were increased pain tolerance and hypotonia, as previously reported by others (Soorya *et al*. 2013). We observed a high frequency of chewing difficulties (58% of the individuals), which have been previously reported in the literature (Soorya *et al.* 2013; Costales & Kolevzon 2015; Bonaglia *et al*. 2011). We also observed a high frequency of sparse eyebrows in our cohort (80%), which is a feature described recently in two individuals with *SHANK3* point mutations (De Rubeis *et al.* 2018) and it could be included as an additional clinical feature in the individuals' morphological evaluation. Only three children were able to speak full sentences in our cohort, and about 75% of our individuals were able to walk but with a delayed onset, which is in line with a global developmental delay observed in different PMS cohorts (Sarasua *et al*. 2011).

Individual P32 represents an exception in PMS cohort, since he was only diagnosed at 18 years of age. He carries the smallest deletion involving *SHANK3* and no other pathogenic CNV was identified. He presents normal literacy skills, developed speech with slightly impaired phonemic fluency, and average IQ score (IQ = 96). To our knowledge, this represents the first case of *SHANK3* associated with normal IQ. Tabet *et al*. 2017 reported a mother of an individual of PMS with deletion 0.067 kb in *SHANK3*, who presents non-verbal IQ = 75, with no history of speech delay, no significant autistic symptoms, no psychiatric axis comorbidities and normal medical history. Therefore, these cases expand the spectrum of clinical variability caused by haploinsufficiency of *SHANK3*. Deeper genomic studies in unusual cases, such as the one here reported, could unravel pathways and mechanisms that lead to a less severe clinical outcome. This approach could open new opportunities for drug discovery.

We observed a high frequency of ASD (~73.5%) in our cohort, confirming it as a clinical feature of PMS (Sarasua *et al.* 2011; Soorya *et al.* 2013; Sarasua *et al.* 2014; De Tabet *et al.* 2017; Rubeis *et al.* 2018). Although the presence of autistic features was surveyed via questionnaire in about half of the samples, the frequency of ASD was similar between those diagnosed by a medical professional and those whose autistic behavior was based only on the questionnaire. We did not observe significant correlation between ASD and deletion size, which can be attributed to limitations in sample size or in evaluating ASD in patients with severe neurodevelopmental delay generally associated with larger deletions (Tabet *et al.* 2017; Sarasua *et al*. 2011). Notably, even though we were not able to assess the degree of intellectual disability in most of our individuals as our method was

questionnaire-based, all except one individual did have global developmental delay such as poor or lack of language and reduced cognitive ability, which is the main phenotype of PMS.

PMS is a relatively common syndrome among both individuals with ASD and intellectual deficiency (Sarasua *et al.* 2011; De Rubeis *et al*. 2018). Indeed, we observed a PMS frequency at about 0.60% in both our ASD individuals and ID cohort. While the proportion of PMS in our ASD individuals was comparable to other estimates in the literature (~1%) (Moessner *et al.* 2007; Boccuto *et al.* 2013; Leblond *et al.* 2014), the frequency in ID fell within the lower range of those estimates (~2%) (Leblond *et al.* 2014), possibly because ID cohorts are clinically more heterogeneous than those that include only ASD individuals.

The cluster analysis was performed to verify which individuals were more clinically similar to each other and which comorbidities discriminate the clusters. Unlike previous studies (Tabet *et al.* 2017), our clustering included a larger number of comorbidities, resulting in four groups. Due to our relative small sample size, we opted to discuss only the findings with significant differences. Two out of these four groups differed from each other regarding to lymphedema, renal abnormalities, language impairment, which in turn were correlated with deletion size, reinforcing the association of these comorbidities with deletion size (Soorya *et al*. 2013; Sarasua *et al.* 2014; Tabet *et al.* 2017). It is of note that lymphedema was only present in individuals with deletions larger than 4.3 Mb, and its onset occurred mainly after 10 years of age (3 out 4 individuals), reinforcing that lymphedema is dependent on age (Sarasua *et al.* 2014). Renal abnormalities were present in individuals with deletion larger than 1.3 Mb and this comorbidity was present in all clusters except for cluster group 4 (with lower mean deletion size), further corroborating that *SHANK3* disruption does not seem to be sufficient to cause renal abnormalities (De Rubeis *et al*. 2018). The penetrance of renal abnormalities in PMS individuals varies from 17% to 38% in the literature and at least four genes, *UPK3A*, *ZBED4*, *CELSR1*, and *FBLN1*, have been considered as candidates for this comorbidity (Dhar *et al.* 2010; Mitz *et al.* 2018). In our analysis, we observed that the penetrance of renal abnormalities was about 2.5 times higher in deletions involving *ZEBD4* and *CELSR1* than in deletion of *ZEBD4* only, thus suggesting that the development of renal abnormalities in PMS individuals could be caused by an additive effect of these genes. As the penetrance was only up to 40.0% when

deletions involved all four candidate genes, it is likely that other factors contribute to this comorbidity in PMS.

Conclusions

In summary, our data support the importance of genetic factors in the etiology of the clinical variability and confirm the findings regarding the impact of 22q13 deletions on several features such as ASD and hypotonia, and defines sparse eyebrows as a clinical dysmorphic feature in the Brazilian PMS cohort. We also showed that 6.9% of PMS individuals from our cohort - have additional CNVs, including pathogenic ones, and we recommend that they be interpreted as being able to contribute to the phenotype. We estimated a minimal deletion size for the development of comorbidities such as lymphedema, renal problem and speech impairment, an information that may change prognosis in PMS diagnosed in early life. We also identified the first case of a male individual carrying *SHANK3* deletion with a very mild phenotype, which reinforces the idea that some individuals show some degree of resilience to such mutations.

List of abbreviations

ASD: Autism spectrum disorder

PMS: Phelan-McDermid syndrome

MLPA: Multiplex ligation probe amplification

Array-CGH: Microarray-based comparative genome hybridization

FISH: Fluorescent in situ hybridization

CNV: Copy number variant

ID: Intellectual disability

CMA: Chromosome microarray analysis

SNP-array: Single nucleotide polymorphism array

VOUS: Variant of uncertain significance

SD: Standard deviation

Ethics approval and consent to participate

All study participants signed the written informed consent, and the genetic study has been positively reviewed by the ethics committee of the Brazilian National Research Ethics Commission (CAAE43559314.0.0000.5464).

Consent for publication

All individuals/families agree to publishing the presented work.

Availability of data and materials

Additional files are provided with the manuscript. Individual information for each individuals is available from the corresponding author on reasonable request.

Conflict of interest

The authors declare that there was no conflict of interest.

Funding

The work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP/ CEPID (2013/08028-1; 2016/17392-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (303712/2016-3, 466651/2014-7) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (#5044854).

Authors' contributions

CISC, EVB, HF and MRSPB designed the study and wrote the manuscript. CISC and EVB analyzed and interpreted the genetic and clinical data. FM and MV performed and reviewed the clustering and statistical analysis. HF intermediated the communication with the individuals' families. NL performed the MLPA tests in the ASD cohort, AK and CR performed the CMA test in the ID cohort. RAF, RHAB, BAP and ALSP evaluated the pictures of individuals for the morphological analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank the "Associação Amigos e Familiares da Síndrome de Phelan-McDermid" from Brazil, Claudia Spadoni in particular, for all the support they provided and for encouraging us to continue this research.

Bibliography

Barakat, A.J., Pearl, P.L., Acosta, M.T. and Runkle, B.P. 2004. 22q13 deletion syndrome with central diabetes insipidus: a previously unreported association. *Clinical dysmorphology* 13(3), pp. 191–194.

Boccuto, L., Lauri, M., Sarasua, S.M., et al. 2013. Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *European Journal of Human Genetics* 21(3), pp. 310–316.

Bonaglia, M.C., Giorda, R., Beri, S., et al. 2011. Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with Phelan/McDermid syndrome. *PLoS Genetics* 7(7), p. e1002173.

Cochoy, D.M., Kolevzon, A., Kajiwara, Y., et al. 2015. Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID. *Molecular autism* 6, p. 23.

Costales, J.L. and Kolevzon, A. 2015. Phelan-McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. *Neurotherapeutics* 12(3), pp. 620–630.

Demeer, B., Andrieux, J., Receveur, A., et al. 2013. Duplication 16p13.3 and the CREBBP gene: confirmation of the phenotype. *European Journal of Medical Genetics* 56(1), pp. 26–31.

Dhar, S.U., del Gaudio, D., German, J.R., et al. 2010. 22q13.3 deletion syndrome: clinical and molecular analysis using array CGH. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 152A(3), pp. 573–581.

Fontes, M.I.B., Santos, A.P., Molck, M.C., et al. 2016. Genotype-phenotype correlation of 16p13.3 terminal duplication and 22q13.33 deletion: Natural history of a patient and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 170(3), pp. 766–772.

Fujita, Y., Mochizuki, D., Mori, Y., et al. 2000. Girl with accelerated growth, hearing loss, inner ear anomalies, delayed myelination of the brain, and del(22)(q13.1q13.2). *American Journal of Medical Genetics* 92(3), pp. 195–199.

Geckinli, B.B., Aydin, H., Karaman, A., et al. 2015. CLINICAL REPORT OF A PATIENT WITH DE NOVO TRISOMY 12q23.1q24.33. *Genetic counseling (Geneva, Switzerland)* 26(4), pp. 393–400.

Kearney, H.M., Thorland, E.C., Brown, K.K., Quintero-Rivera, F., South, S.T. and Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee 2011. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genetics in Medicine* 13(7), pp. 680–685.

Kolevzon, A., Angarita, B., Bush, L., et al. 2014. Phelan-McDermid syndrome: a review of the literature and practice parameters for medical assessment and monitoring. *Journal of neurodevelopmental disorders* 6(1), p. 39.

Krepischi, A.C., Achatz, M.I.W., Santos, E.M., et al. 2012. Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. *Breast Cancer Research* 14(1), p. R24.

Leblond, C.S., Nava, C., Polge, A., et al. 2014. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genetics* 10(9), p. e1004580.

Mitz, A.R., Philyaw, T.J., Boccuto, L., et al. 2018. Identification of 22q13 genes most likely to contribute to Phelan McDermid syndrome. *European Journal of Human Genetics* 26(3), pp. 293–302.

Moessner, R., Marshall, C.R., Sutcliffe, J.S., et al. 2007. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics* 81(6), pp. 1289–1297.

Monteiro, P. and Feng, G. 2017. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nature Reviews. Neuroscience* 18(3), pp. 147–157.

Moreira, D.P., Griesi-Oliveira, K., Bossolani-Martins, A.L., et al. 2014. Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy. *Plos One* 9(9), p. e107705.

Phelan, K. and McDermid, H.E. 2011. The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Molecular syndromology*.

De Rubeis, S., Siper, P.M., Durkin, A., et al. 2018. Delineation of the genetic and clinical spectrum of Phelan-McDermid syndrome caused by SHANK3 point mutations. *Molecular autism* 9, p. 31.

Sarasua, S.M., Boccuto, L., Sharp, J.L., et al. 2014. Clinical and genomic evaluation of 201 patients with Phelan-McDermid syndrome. *Human Genetics* 133(7), pp. 847–859.

Sarasua, S.M., Dwivedi, A., Boccuto, L., et al. 2011. Association between deletion size and important phenotypes expands the genomic region of interest in Phelan-McDermid syndrome (22q13 deletion syndrome). *Journal of Medical Genetics* 48(11), pp. 761–766.

Soorya, L., Kolevzon, A., Zweifach, J., et al. 2013. Prospective investigation of autism and genotype-phenotype correlations in 22q13 deletion syndrome and SHANK3 deficiency. *Molecular autism* 4(1), p. 18.

Tabet, A.-C., Rolland, T., Ducloy, M., et al. 2017. A framework to identify contributing genes in patients with Phelan-McDermid syndrome. *npj Genomic Medicine* 2, p. 32.

Supplementary Material

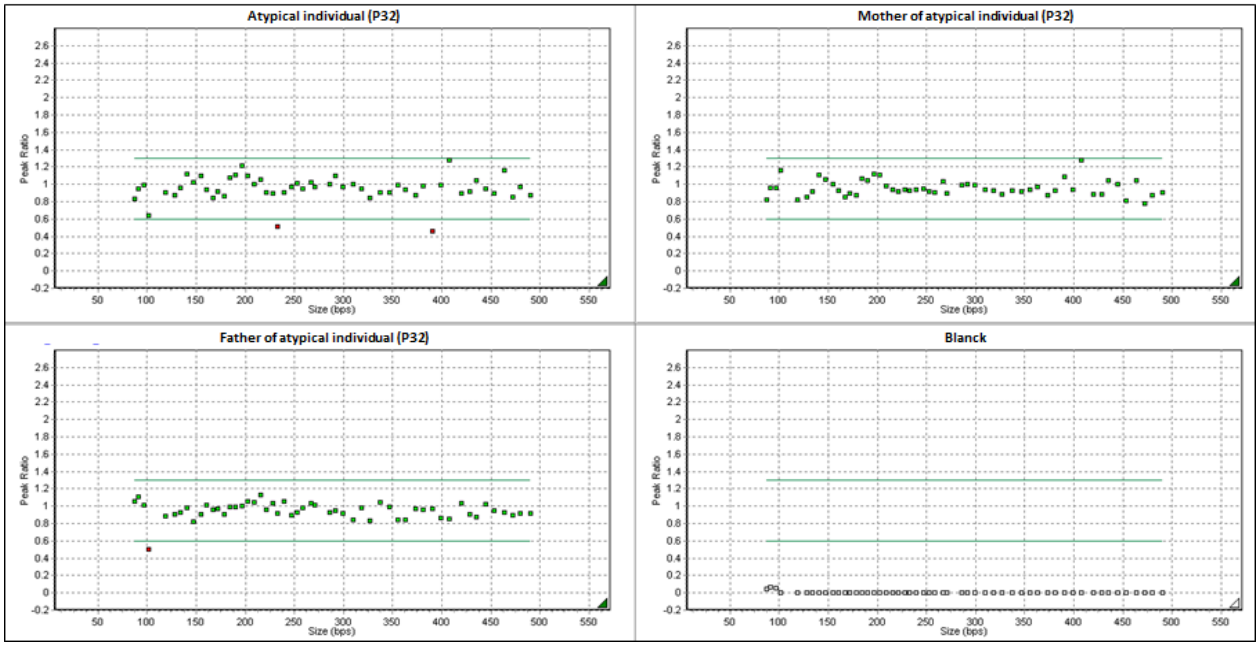


Figure S1. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) test of atypical individual (P32) and his parents, confirm that its a de novo deletion.

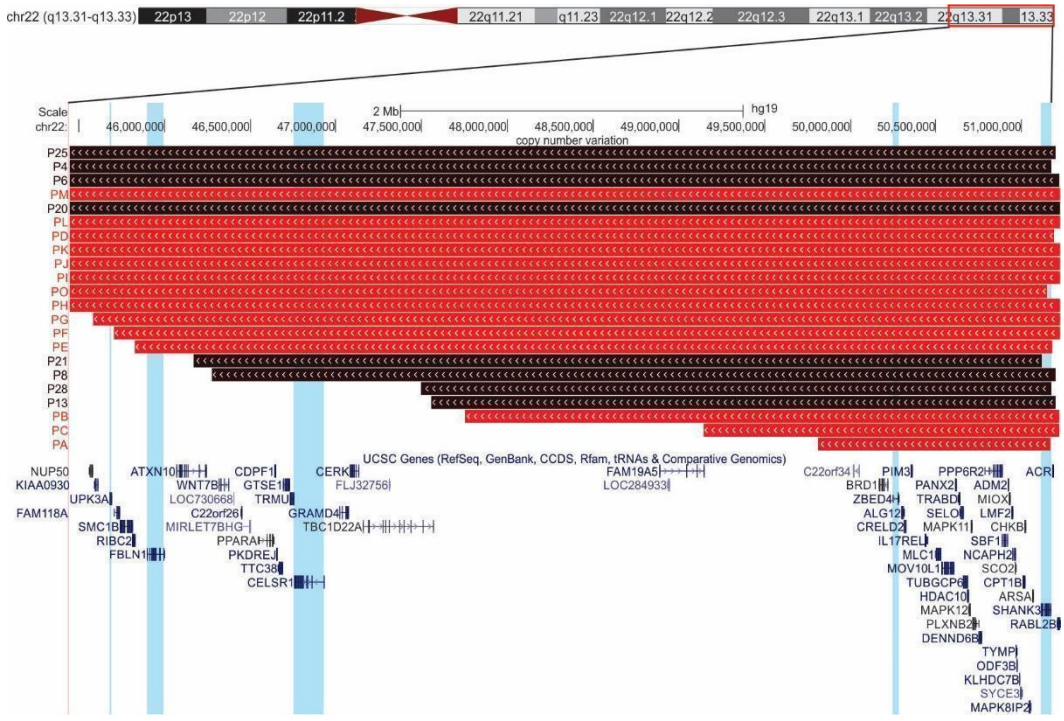


Figure S2. 22q13 deletions in 22 patients with renal abnormalities. Deletions found in our cohort are represented by black lines, those reported previously are shown in red (Tabet *et al*. 2017, Soorya *et al*. 2013, Lei *et al*. 2016). Candidate genes *FBLN1*, *CELSR1*, *ZBED4* and *SHANK3* gene are highlighted by the blue vertical lines.

Table S1. Frequency of dysmorphic features seen in PMS individuals.

Dysmorphic features	N	Total	%
Nails			
Hyperconvex	2	26	7.7%
Hypoplastic / Small	2	26	7.7%
Ears			
Dysplastic Ears	3	26	11.5%
Large ears (macrotia)	7	26	26.9%
Ear low set	2	26	7.7%
Prominent ears	1	26	3.8%
Proeminent anthelix	5	26	19.2%
Helix Prominent	1	26	3.8%
Eyes			
Epicanthus	2	26	7.7%
Ascending palpebral fissure	3	26	11.5%
Descending palpebral fissure	2	26	7.7%
Hypotelorism	1	26	3.8%
Distichiasis	16	26	61.5%
Strabismus	3	26	11.5%
Long eyelashes	3	26	11.5%
Nose			
Large/wide nose	11	26	42.3%
Tubular nose	4	26	15.4%
Face			
Flat face	4	26	15.4%
Face long	4	26	15.4%
Triangular face	1	26	3.8%
Prominent mandible /prognathism	1	26	3.8%
High forehead	9	26	34.6%
Philtrum			
Long philtrum	2	26	7.7%
Philtrum deep	7	26	26.9%
Short philtrum	1	26	3.8%
Wide philtrum	2	26	7.7%
Mouth			
Down-turned mouth	4	26	15.4%
Tented lip	1	26	3.8%
Macrostomy	2	26	7.7%
Thick lower lip	2	26	7.7%
Thin upper lip	1	26	3.8%
Teeth			
Small teeth	1	26	3.8%
Spaced teeth	1	26	3.8%
Fingers			
Clinodactyly	15	26	57.7%
Feet			
Elongated feet	1	26	3.8%
Foot broad	3	26	11.5%
Overlapping toes	4	26	15.4%

Short toes	1	26	3.8%
Partial syndactyly of toes 2–3	2	26	7.7%
Toes widely spaced	6	26	23.1%
Elongated toes	3	26	11.5%
Others			
Sparce eyebrowns	21	26	80.8%

Table S2. Clinical findings in Brazilian PMS individuals. N/A = not available; + = comorbidity is present in the individual; - = comorbidity absent in the individual; F = female, M = male.

ID	Sex	Deletion size (Mb)	Lymphedema	Chewing difficulties	Hypohidrosis	Constipation and/or diarrhea	Sleep disturbance	Cardiac abnormalities	Recurring upper respiratory tract infections	Renal abnormalities	Strabismus	Gastroesophageal reflux	Hypotonia	Pain tolerance	Speech
P1	F	2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
P2	F	7.8	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
P3	F	NA	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	N/A	-
P4	M	8.3	N/A	+	-	+	+	-	-	+	+	N/A	+	+	-
P5	M	NA	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
P6	M	8.3	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
P7	F	1.5	N/A	+	N/A	N/A	+	-	-	N/A	-	+	+	+	-
P8	F	4.9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
P9	F	2.4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
P10	F	2.7	-	+	-	-	+	-	-	-	-	N/A	N/A	-	-
P11	F	0.5	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
P12	M	49	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
P13	M	3.6	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
P14	M	0.9	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
P15	M	7.7	+	N/A	-	-	-	-	+	-	-	N/A	+	+	-
P16	M	5.9	-	-	N/A	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P17	F	74	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
P18	F	0.1	-	+	+	+	+	-	+	N/A	-	+	+	+	-
P19	F	1.5	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
P20	F	8.0	+	N/A	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
P21	F	4.9	-	-	-	-	N/A	-	-	+	-	+	-	-	-
P22	M	NA	N/A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
P23	F	NA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
P24	F	7.9	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
P25	F	8.79	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
P26	M	2.1	-	+	+	-	N/A	-	-	-	-	-	+	+	-
P27	M	9.0	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
P28	F	3.67	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
P29	M	NA	N/A	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
P30	M	3.25	-	-	N/A	+	-	+	-	-	N/A	-	+	+	+
P31	M	0.9	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
P32	M	0.1	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	N/A	-	+

P33	F	4.39	+	+	N/A	N/A	-	-	-	-	N/A	+	+	+	-
P34	M	8.1	-	-	-	-	+	-	-	-	N/A	-	N/A	-	-

Table S3. Clustering analysis of PMS individuals according to the sex and comorbidities seen among them.

	Group			
	1	2	3	4
Female : Male	6:4	6:3	4:0	0:6
Deletion size (mean and range)	4.28 Mb (0.07-8.18 Mb)	5.2 Mb (0.1-9.05 Mb)	5.58 Mb (3.67-8.79 Mb)	1.22 Mb (0.04-3.25 Mb)
Comorbidities				
Lymphedema	0% (0/10)	57% (4/7)	0% (0/4)	0% (0/6)
Chewing difficulty	30% (3/10)	100% (7/7)	0% (0/4)	83% (5/6)
Hypohidrosis	56% (5/9)	14% (1/7)	0% (0/4)	40% (2/3)
Constipation and/or diarrhea	10% (1/10)	86% (6/7)	25% (1/4)	50% (3/3)
Sleep disturbance	60% (6/10)	56% (5/9)	0% (0/3)	0% (0/5)
Cardiac abnormalities	0% (0/10)	0% (0/9)	0% (0/4)	33% (2/6)
Renal abnormalities	20% (2/10)	25% (2/8)	100% (4/4)	0% (0/6)
Recurring upper respiratory tract infections	63% (5/8)	86% (6/7)	50% (2/4)	33% (2/6)
Gastroesophageal reflux	56% (5/9)	86% (6/7)	75% (3/4)	0% (0/6)
Hypotonia	88% (7/8)	100% (9/9)	25% (1/4)	80% (4/5)
Increased pain tolerance	88% (7/8)	100% (9/9)	25% (1/4)	80% (4/5)
Speech	0% (0/8)	0% (0/7)	0% (0/3)	50% (3/6)

Table S4. p-value of Mann Whitney test performed for each comorbidity's frequency in our cohort (N=34)

Comorbidity	Mann-Whitney test (p-value)
Increased pain tolerance	0.850
Hypotonia	0.850
Recurring upper respiratory tract infections	0.367
Gastroesophageal reflux	0.106
Sleep disturbance	0.942
Seizures (febrile and/or non-febrile)	0.500
Constipation and/or diarrhea	0.577
Renal abnormalities	**0.011**
Lymphedema	**0.048**
Strabismus	0.374
Cardiac abnormalities	0.493
Chewing difficult	0.126
Swallowing difficult	0.842
Hypohidrose	0.215

Table S5. Fourteen individuals with 22q13.3 deletion and renal abnormalities previously described in the literature for which data was available online.

Article	Individual ID (this article)	Individual ID (original article)	Deletion (hg19[GRCh37] - 22q13)		Size (pb)	Phenotype
Tabet et al (2017)	A	27	49813066	51170164	1357098	Hydronephrosis
	B	69	47751912	51219150	3467238	Kidney abnormalities
	C	15	49145909	51219150	2073241	Left kidney duplicity
	D	19	43759828	51186190	7426362	Left pyeloureteral junction
	E	4	45828060	51178405	5350345	Unilateral multicystic dysplastic kidney with normal renal function
Soorya et al (2013)	F	28	45705241	51224208	5518967	Not specified by patient, but authors report vesicoureteral reflux, hydronephrosis, renal agenesis, extrarenal pelvis, dysplastic kidney, and bilateral horseshoe kidneys and pyelectasis among the 12 patients with renal abnormalities.
	G	17	45583935	51224208	5640273	
	H	21	45428606	51224208	5795602	
	I	22	44800014	51224208	6424194	
	J	6	44427703	51224208	6796505	
	K	4	44321641	51224208	6902567	
	L	13	43745129	51224208	7479079	
	M	16	42918711	51224208	8305497	
Lei et al (2016)	O	P1	44882702	51146914	6264212	Double kidney effusion

Table S6. One hundred and one patients from three previously published works (Tabet *et al*, 2017; Lei *et al*, 2016; Soorya *et al*, 2013) and from our cohort included in the analysis of the frequency of renal abnormalities. All chromosomal coordinates are based on the hg19 version of the human reference genome. Color blue = individuals from Tabet *et al* (2017), green = individuals from Soorya *et al* (2013), orange = individuals from our cohort, and black = individuals from Lei *et al* (2016).

ID	Start	End	ZBED4 (hg19) 50247497-50283726	CELSR1 (hg19) 46756731-46933067	*UPK3A* (hg19) 45680868-45691755	FBLN1 (hg19) 45898719-45997014
individuals without renal abnormalities						
5	45550500	51169045	Yes	Yes	Yes	Yes
6	44187687	51169045	Yes	Yes	Yes	Yes
8	43872933	51169045	Yes	Yes	Yes	Yes
10	51072162	51169045	No	No	No	No
11	50452208	51169045	No	No	No	No
13	50883397	51178264	No	No	No	No
14	47080299	51219009	Yes	No	No	No
16	51123291	51219150	No	No	No	No
18	51123291	51219150	No	No	No	No
23	49513930	51218950	Yes	No	No	No
26	49623769	51186190	Yes	No	No	No

33	50937228	51178405	No	No	No	No
34	51123291	51178405	No	No	No	No
36	51123291	51219150	No	No	No	No
37	51132603	51178405	No	No	No	No
38	43331411	51178405	Yes	Yes	Yes	Yes
39	43415599	51178264	Yes	Yes	Yes	Yes
40	48802104	51178264	Yes	No	No	No
41	44864865	51178264	Yes	Yes	Yes	Yes
42	44934059	49522658	Yes	Yes	Yes	Yes
47	46023639	51195728	Yes	Yes	No	No
53	51116107	51170223	No	No	No	No
55	43730323	51178264	Yes	Yes	Yes	Yes
56	42320845	51178405	Yes	Yes	Yes	Yes
57	42069936	51178264	Yes	Yes	Yes	Yes
58	50055568	51178264	Yes	No	No	No
59	43900960	49565875	Yes	Yes	Yes	Yes
61	49995123	51178264	Yes	No	No	No
64	50671279	51219150	No	No	No	No
65	50004759	51178264	Yes	No	No	No
66	49536180	51193680	Yes	No	No	No
67	43057749	51219150	Yes	Yes	Yes	Yes
68	48224328	51219150	Yes	No	No	No
70	45795093	51304566	Yes	Yes	No	No
71	45547030	51186390	Yes	Yes	Yes	Yes
74	45522296	51170223	Yes	Yes	Yes	Yes
76	51123491	51178264	No	No	No	No
77	47648233	51211392	Yes	No	No	No
78	49745407	51195728	Yes	No	No	No
79	51121362	51234442	No	No	No	No
80	48802104	51178264	Yes	No	No	No
82	47357143	51178264	Yes	No	No	No
83	50558914	51178264	No	No	No	No
84	46204739	51178264	Yes	Yes	No	No
SH5	46143471	51224208	Yes	Yes	No	No
SH8	49574124	51224208	Yes	No	No	No
SH9	49028732	51224208	Yes	No	No	No
SH10	51122946	51224208	No	No	No	No
SH11	49028732	51224208	Yes	No	No	No
SH12	42773732	51224208	Yes	Yes	Yes	Yes
SH15	45902119	51224208	Yes	Yes	No	No
SH18	50077362	51224208	Yes	No	No	No

SH19	48551989	51206201	Yes	No	No	No
SH20	51083118	51224208	No	No	No	No
SH25	46787434	51224208	Yes	Yes	No	No
SH27	51115526	51234443	No	No	No	No
SH30	49004395	51224208	Yes	No	No	No
SH31	42822943	51224208	Yes	Yes	Yes	Yes
P1	48810119	51211393	Yes	No	No	No
P2	43371148	51186249	Yes	Yes	Yes	Yes
P7	49608334	51186249	Yes	No	No	No
P9	48771374	51171678	Yes	No	No	No
P10	48434307	51178213	Yes	No	No	No
P11	50667787	51171678	No	No	No	No
P12	51122360	51171678	No	No	No	No
P14	48627093	49525079	Yes	No	No	No
P15	43492638	51197766	Yes	Yes	Yes	Yes
P16	45235285	51171678	Yes	Yes	Yes	Yes
P17	51104247	51178574	No	No	No	No
P19	49595567	51178405	Yes	No	No	No
P24	49595567	51178405	Yes	No	No	No
P26	49123097	51224252	Yes	No	No	No
P27	42152988	51211392	Yes	Yes	Yes	Yes
P30	47963467	49565875	Yes	No	No	No
P31	50274217	51197766	Yes	No	No	No
P32	51112491	51224252	No	No	No	No
P33	46814671	51211392	Yes	Yes	No	No
P34	43094876	51197838	Yes	Yes	Yes	Yes
Individuals with renal abnormalities						
4	**45828060**	**51178405**	**Yes**	**Yes**	**No**	**No**
15	**49145909**	**51219150**	**Yes**	**No**	**No**	**No**
19	**43759828**	**51186190**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**
27	**49813066**	**51170164**	**Yes**	**No**	**No**	**No**
69	**47751912**	**51219150**	**Yes**	**No**	**No**	**No**
L1	**44882702**	**51146914**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**
SH4	**44321641**	**51224208**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**
SH6	**44427703**	**51224208**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**
SH13	**43745129**	**51224208**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**
SH16	**42918711**	**51224208**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**
SH17	**45583935**	**51224208**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**
SH21	**45428606**	**51224208**	**Yes**	**Yes**	**Yes**	**Yes**

SH22	44800014	51224208	Yes	Yes	Yes	Yes
SH28	45705241	51224208	Yes	Yes	No	No
P4	42865291	51219009	Yes	Yes	Yes	Yes
P6	41194910	49397713	Yes	Yes	Yes	Yes
P8	46276401	51197766	Yes	Yes	No	No
P13	47557877	51197766	Yes	No	No	No
P20	43213659	51224252	Yes	Yes	Yes	Yes
P21	46168628	51115526	Yes	Yes	No	No
P25	42399686	51197766	Yes	Yes	Yes	Yes
P28	47497833	51171678	Yes	No	No	No
1	44882702	51146914	Yes	Yes	Yes	Yes

CAPÍTULO 3

Modelagem in vitro de neurônios de pacientes com mutações em TBCK utilizando iPSC

Elisa Varella-Branco[1], Angela May Suzuki[1], Danielle de Paula Moreira[1], Arquimedes Cheffer[2], Frederico Monfardini[1], Karina Griesi-Oliveira[1,3], Karina de Souza Weinmann[1], Andréa Laurato Sertié[3], Henning Ulrich[2], Maria Rita Passos-Bueno[1]

[1]Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco (CEGH-CEL), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil

[2] Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil

[3]Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Hospital Albert Einstein, São Paulo, SP , Brasil.

Resumo

Variantes de perda-de-função bialélicas no gene *TBCK* causam a recém-descrita síndrome IHPRF3, caracterizada por deficiência intelectual, e outros sinais clínicos, como hipotonia e transtorno do espectro autista (TEA), cuja frequência para este último ainda é incerta entre os indivíduos com essa síndrome. Há ainda evidências de que ocorra neurodegeneração do sistema nervoso central e periférico, a qual pode ter início no período da infância. *TBCK* é uma proteína pouco conhecida e o mecanismo patofisiológico que leva aos fenótipos alterados do sistema nervoso nesses pacientes é ainda desconhecido. Com o intuito de contribuir para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes a deficiência de *TBCK*, neste trabalho nós caracterizamos neurônios de pacientes com IHPRF3 utilizando células tronco pluripotentes induzidas (iPSC) derivadas de células somáticas. A obtenção dos tipos neuronais de interesse (células neuroprogenitoras, neurônios imaturos e maturos) a partir de iPSC de indivíduos controles e de pacientes foi bem sucedida, conforme caracterização destas células com marcadores celulares dos diferentes tipos celulares bem como estudos de eletrofisiologia nas células neuronais. Os neurônios de pacientes com mutações em *TBCK* apresentam alterações na morfologia neuronal como aumento do tamanho do soma e diminuição do tamanho dos neuritos. Além

disso, neurônios de pacientes apresentam um acúmulo de proteínas pré-sinápticas na região do soma neural, demonstrando que pode haver uma alteração em relação ao transporte das vesículas sinápticas. Os neurônios de pacientes apresentaram ainda níveis de expressão drasticamente alterados de seis genes relacionados ao neurodesenvolvimento, os quais já foram associados ao autismo e deficiência intelectual. Desta forma, o fenótipo neuronal observado no presente estudo se correlaciona com a gravidade da doença e destaca um papel importante de *TBCK* durante o desenvolvimento cerebral.

Introdução

Mutações de perda de função no gene *TBCK* levam a um quadro clínico definido como síndrome da Hipotonia Congênita, Retardo Psicomotor e Características Faciais do tipo 3 (IHPRF3) (#MIM616900). Até o momento, há pouco mais de 30 casos relatados na literatura, em que os sintomas clínicos são extremamente variáveis e incluem: deficiência intelectual, atraso global do desenvolvimento, epilepsia, insuficiência respiratória crônica, características faciais distintas como olhos profundos e lábios superiores em forma de tenda, e menos frequentemente o TEA (Alazami *et al*. 2015; Bhoj *et al.* 2016; Chong *et al.* 2016; Guerreiro *et al*. 2016; Mandel *et al.* 2017; Beck-Wödl *et al.* 2018; Ortiz-González *et al.* 2018; Zapata-Aldana *et al.* 2019; Sumathipala *et al.* 2019). Alguns trabalhos ainda relatam que a síndrome IHPRF3 é uma condição progressiva, e um quadro de neurodegeneração é observado em alguns casos. Os sinais típicos observados em imagens de exames neurológicos, incluindo atrofia cerebral e leucoencefalopatia progressiva, são compatíveis com o processo de neurodegeneração (Bhoj *et al.* 2016; Chong *et al.* 2016; Mandel *et al.* 2017; Ortiz-González *et al.* 2018; Zapata-Aldana *et al.* 2019).

O gene *TBCK* codifica uma proteína composta por três domínios funcionais: um domínio TBC1 (Ter-2, Bub-2 e Cdc16), flanqueado por um domínio tipo quinase N-terminal e um domínio rhodanase (RHOD) na porção C-terminal (Liu *et al.* 2013). Apesar do escasso conhecimento em relação a função deste gene, há evidências de que o *TBCK* atue na regulação das vias mTOR e autofágica-lisossômica. A via mTOR não só está diretamente relacionada a autofagia, mas também atua na regulação de processos como tamanho, sobrevivência, migração e proliferação celular. Assim como a via mTOR, a autofagia é fundamental para a manutenção da integridade neural e desenvolvimento do

sistema nervoso, e perturbações neste processo já foram associadas a doenças do neurodesenvolvimento e doenças neurodegenerativas (Liu *et al.* 2013; Bhoj *et al.* 2016; Beck-Wödl *et al.* 2018). Recentemente, mostrou-se que fibroblastos de pacientes com mutações em *TBCK* possuem uma disfunção do complexo autofago-lisossomo, e sugere-se que tal alteração seja ocasionada por uma deficiência no perfil de ativação da via de sinalização mTOR (Ortiz-González *et al.* 2018) e/ou por deficiência na fusão entre autofagossomos e lisossomos, as quais seriam possivelmente dependente de proteínas Rab GTPases (Beck-Wödl *et al.* 2018). O domínio TBC, também é previsto como tendo função GAP (do inglês GTPase-activating proteins) contra proteínas Rab GTPases (Pan *et al.* 2006), cujo ciclo de ativação (ligada a GTP) e inativação (ligada a GDP) coordena o tráfego de membranas, incluindo brotamento de vesículas e seleção do cargo, reconhecimento da membrana alvo e fusão de membranas (Langemeyer *et al.* 2018). Desta forma, como as mutações de perda de função em *TBCK* causam os sintomas neurológicos de IHPRF3 ainda não está claramente elucidado.

As mutações de perda de função em *TBCK* causativas de IHPRF3 descritas na literatura estão localizadas nos domínios quinase e TBC1, e na maioria dos casos levam a um código de parada prematuro (Bhoj *et al.* 2016; Chong *et al.* 2016; Guerreiro *et al.* 2016; Mandel *et al.* 2017; Beck-Wödl *et al.* 2018; Ortiz-González *et al.* 2018; Zapata-Aldana *et al.* 2019). Os poucos estudos que realizaram análise funcional de tais mutações, mostraram que há uma redução drástica da expressão proteica de TBCK, ocasionada muito possivelmente como consequência do processo de decaimento do mRNA (*Non-sense mediated decay*) em virtude da localização dos códigos de parada prematuro serem no início do produto gênico (Bhoj *et al.* 2016; Ortiz-González *et al.* 2018; Beck-Wödl *et al.* 2018). As mutações de perda de função identificada nos casos aqui descritos estão localizadas próximas ao domínio RHOD, e ao contrário de outros casos da literatura, os resultados preliminares do nosso grupo sugerem que células neurais desses pacientes brasileiros apresentam expressão de uma proteína truncada, muito possivelmente não funcional, e que *TBCK* esteja envolvido na regulação da formação de vesículas intracelulares que impactam no processo de autofagia em progenitoras neurais (NPCs) (Moreira & Suzuki 2019, em preparação). Desregulação dessas vias biológicas pode influenciar em vários processos celulares, como proliferação, migração e renovação celular (Menzies *et al.* 2015). Sendo assim, dada a complexidade dos mecanismos moleculares e celulares em células neurais com deficiência de *TBCK*, cujo efeito é claramente observado

no quadro clínico dos pacientes, destaca-se a importância em elucidar como a deficiência de *TBCK* influencia na morfologia e função dos neurônios desses pacientes. Desta forma, este estudo possui como objetivo realizar a modelagem *in vitro* de células neuronais de indivíduos com IHPRF3 diferenciadas a partir de células tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), a fim de elucidar os mecanismos moleculares e celulares patogênicos envolvidos na IHPRF3.

Metodologia

Casuística e aspectos éticos

As pacientes foram atendidas no serviço de aconselhamento genético do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco (CEGH-CEL). Os critérios aplicados para avaliação de gravidade foram definidos utilizando o DSM-5 (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* - 5th edition), e os testes CARS (*Childhood Autism Rating Scale*) e Vineland. O estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa no Brasil, Processo no CAAE43559314.0.0000.5464. As amostras de sangue foram coletadas após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo responsável, de acordo com protocolos anteriormente aprovados pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

O sequenciamento de exoma das duas irmãs foi realizado como parte do projeto de Doutorado de Danielle Moreira (Moreira, 2016). As duas irmãs compartilham variantes raras bi-alélicas no gene *TBCK*: uma variante de códon de parada prematuro no exon 23 herdada do pai (NM_001163435: c.2130C> G; p.Tyr710*) e uma deleção no exon 24 herdada da mãe (NM_001163435: c.2060_2235del; p.Glu687Valfs9*). As variantes foram consideradas patogênicas de acordo com as normas da ACMG (American College of Medical Genetics) (Richards *et al.* 2015).

Geração das células-tronco pluripotente induzidas (iPSC) a partir de células mononucleares do sangue

Células iPSC foram obtidas a partir de PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells* ou células mononucleares do sangue periférico) de pacientes (n=2), da progenitora dos pacientes (n=1) e de controles (n=2) seguindo o protocolo adaptado de Okita *et a*l. (Anon n.d.). Brevemente, culturas de PBMCs dos indivíduos são enriquecidas para o marcador de precursor de eritrócitos CD71, por meio de marcação com *microbeads* e separação magnética. Em seguida, plasmídeos episssomais para a expressão de *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYCL*, *LIN28* e shRNA para p53 são introduzidos nos eritroblastos por nucleofecção. A superexpressão de tais fatores leva a uma série de alterações epigenéticas, que por sua vez, levam as células em um estágio de diferenciação mais avançado a assumirem um estado pluripotente. Após a nucleofecção dos plasmídeos, as células são cultivadas em conjunto com fibroblastos embrionários murinos (MEFs), os quais liberam fatores importantes para o processo de reprogramação e manutenção do estado de pluripotência. Após cerca de duas semanas, as colônias de células iPSC podem ser identificadas por sua morfologia e transferidas para novas placas de cultivo cobertas com Matrigel (Corning) e mantidas com o meio de cultura *Essential* 8.

Diferenciação neuronal

Para a obtenção das células neuronais diferenciados a partir de iPSC, foi realizada a padronização do protocolo estabelecido por Shi *et al.* (2012). Os protocolos de diferenciação neuronal podem variar de acordo com o perfil de expressão das progenitoras neurais e o potencial de diferenciação. O protocolo utilizado em nosso laboratório até então, apresentava como resultado final da diferenciação uma ampla heterogeneidade populacional de células neuronais. Desta forma, consideramos de extrema importância a utilização de um protocolo que fosse mais eficiente em relação a obtenção de uma população neuronal mais homogênea. O protocolo aqui padronizado está disposto no Apêndice I ao final deste trabalho.

Brevemente, as iPSCs foram diferenciadas em neurônios corticais utilizando dupla inibição da sinalização via SMAD seguida por neurogênese *in vitro* (Shi *et al*. 2012; Handel *et al.* 2016). As colônias iPSC foram plaqueadas em placas revestidas com Matrigel e mantidas em meio *Essential 8* até atingirem 80-100% de confluência. Após este período o meio foi alterado para o meio de indução neural (1 N-2: 1 B-27) suplementado com fatores

de inibição de SMAD (1uM dorsomorfina e 10uM SB4315420). O meio N-2 consiste em DMEM / F-12 GlutaMAX, 1 × N-2, 5 μg ml^{-1} de insulina, 1mM l-glutamina, 100μm *nonsential aminoacids*, 100μM 2-mercaptoetanol, e 1% de *PenStrep*. O meio B-27 consiste de Neurobasal, 1 × B-27, 200 mM glutamina e 1% de *PenStrep*. Entre os dias 8 e 12 após o plaqueamento, seguido pelo surgimento de uma camada neuroepitelial uniforme, as células foram coletadas utilizando 10 mg ml^{-1} de dispase, ressuspendidas no mesmo meio de indução suplementado, e plaqueadas em placas revestidas com poli-ornitina e laminina contendo 2 ml de meio de indução neural suplementado com os fatores de inibição SMAD. Após o aparecimento das rosetas as células neuronais foram mantidas por 4 dias em meio neurobasal de N2 e B-27, com suplementação de 20ng/ml FGF2 (*basic fibroblast growth fator*), para promover a expansão das células progenitoras neurais (NSCs). Após estes período as células foram mantida em meio neurasal de N-2 e B-27 sem suplementação de fatores. Uma vez que uma neurogênese substancial tenha ocorrido (por volta do dia 28), as células foram replaqueadas com *Accutase*, e, em seguida, replaqueada pela última vez no dia 35 em placas revestidas com poliornitina e laminina. As células foram cultivadas até mais 50-60 dias após a última passagem, com mudanças de meio a cada dois dias. Foram definidos dois tempos de neurônios utilizados nos experimentos: neurônios imaturos (<45 dias), e neurônios maduros (>60 dias). Um resumo das amostras diferenciadas utilizadas para cada experimento está disposto na Tabela S1.

Extração de RNA e análise de expressão por qPCR

O RNA total foi extraído em diferentes tempos de diferenciação: iPSC, NSCs, neurônios imaturos e neurônios maduros (Tabela S1). As amostras foram caracterizadas através da quantificação do nível de expressão de mRNA ao longo da diferenciação utilizando-se os principais marcadores de pluripotência *OCT4*, marcadores células tronco neuronais *PAX6* e *SOX1* e marcadores neuronais *CUX1*, *MAP2* e *Tbr1*, respectivamente. Além disso, a fim de verificar a expressão de *TBCK* em NSCs e neurônios, foram quantificados os níveis de transcritos.

As amostras de RNA foram extraídas utilizando-se kit NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e a quantificação do RNA foi analisada utilizando-se o equipamento Eppoch (Biotek).

Amostras de RNA (1ug) foram sintetizadas em cDNA utilizando o kit Super Script III First Strand Synthesis (Invitrogen), e as reações de qPCR foram realizadas com Fast

SYBR Green (Applied Biosystems) utilizando-se o equipamento QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystem). Os níveis de expressão dos genes alvo foram normalizados utilizando o gene *housekeeping* TBP. Os *primers* foram desenhados utilizando Primer Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) e estão dispostos na Tabela S2. Todas as amostras de qPCR foram feitas em duplicata. Os resultados foram analisados utilizando-se a média das duplicatas de expressão gênica normalizada em relação à amostra calibradora utilizando o método comparativo de CT (método ΔCt).

Western blotting

A extração proteica das amostras de neurônios maduros foi realizada utilizando-se o kit NucleoSpin® TriPrep (Macherey-Nagel) segundo as instruções do fabricante. As concentrações proteicas foram estimadas utilizando o kit de ensaio de microproteínas BCA (BioAgency). 20ug de proteína de cada amostra foram separados por SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose, que foram bloqueadas com BSA 5% em TBST (137mM NaCl, 20mM Tris-HCl ph 7,5 0,1% Tween-20) depois incubadas com anticorpo primário p16 (Abcam - ab108349) *overnight* a 4°. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 4x com TBST e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos conjugado a peroxidase HRP (1: 2000, Cell Signaling Technology). A intensidade das bandas foram determinadas por densitometria utilizando o *software NIH ImageJ* (http://rsbweb.nih.gov/ij/). O nível de proteína alvo foram quantificados e normalizados para os correspondentes níveis de β-actina (Tabela S1). Este experimento foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Andrea Sertié, do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo.

Imunofluorescência

Os neurônios maduros foram fixados com PBS contendo paraformaldeído 4% por 10 minutos, e posteriormente incubadas em temperatura ambiente durante 30 min em uma solução de permeabilização contendo PBS e TritonX 0,2%. Após este período as células foram incubadas por mais 1 hora na solução de bloqueio contendo PBS e BSA 5%. Os anticorpos primários foram mantidos *overnight* a 4 °C. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-MAP2 (ab11267, Abcam), anti-Synapsin (ab8, Abcam), anti-Tuj1 (ab7751, Abcam) e anti-TBCK (sc-81865, Santa Cruz Biotechnology).

Após as lavagens com PBS, as células foram incubadas à temperatura ambiente por mais 1 hora com anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor594 ou AlexaFluor488 (Thermo Fisher Scientific; 1: 400). Os núcleos foram corados com DAPI (VECTASHIELD, Laboratórios vetoriais). As imagens de fluorescência foram obtidas utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM 710.

Eletrofisiologia utilizando os neurônios corticais cultivados a partir de iPSC

Os ensaios de *Patch-Clamp* foram realizados segundo descrito em Shi *et al*. 2012, utilizando-se amostras das pacientes, da progenitora e controles (Tabela S1). Os registros de atividade elétrica foram feitos em temperatura ambiente, em solução extracelular contendo NaCl 125 mM, NaHCO3 25 mM, NaH2PO4 1,25 mM, KCl 3 mM, CaCl2 2 mM, MgCl2 1 mM, glicose 25 mM e ácido pirúvico 3 mM, pH 7,4. Os eletrodos de vidro (resistência 6-10 MΩ) foram preenchidos com solução intracelular composta por gluconato de potássio 135 mM, NaCl 7 mM, HEPES 10 mM, Na2ATP 2 mM, Na2GTP 0,3 mM e MgCl2 2 mM, pH 7,4. Para todas as células utilizadas, o potencial de membrana no repouso (*rest membrane potential*, RMP) foi determinado e corrigido para o potencial de junção que, para as nossas soluções intra e extracelular, foi de -15 mV. A fim de verificar a capacidade de os neurônios dispararem potenciais de ação (*action potentials*, AP) e calcular os diversos parâmetros associados a eles (amplitude, *half-width*, *rise* e *decay times*), pulsos de corrente (de -20 pA a +150 pA, intervalo de 10 pA) foram aplicados por 1 segundo. O limiar (*threshold*, calculado a partir da primeira derivada no tempo da função voltagem) e a amplitude do AP foram obtidos para o primeiro AP disparado por cada célula. Adicionalmente, a constante de tempo da membrana τ (*membrane time constant*, MTC) foi calculada a partir da resposta do potencial de membrana a injeção de corrente de amplitude de -20 pA. Para que os registros fossem feitos, as células foram visualizadas utilizando-se o microscópio Axiovert 200 (Zeiss). Os registros foram feitos com um amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices), sendo os sinais filtrados a 2 kHz, amostrados a 20 kHz e analisados utilizando os programas Clampfit 10.7 (Molecular Devices) e GraphPad Prism 5. Os resultados são apresentados como a média ± desvio-padrão. Experimento realizado por Dr. Arquimedes Cheffer, em colaboração com o Laboratório do Prof. Dr. Henning Ulrich, do Departamento de Bioquímica, IQ-USP.

Análise de dinâmica e morfologia dos neuritos

A análise da dinâmica dos neuritos, a fim de verificar se haveria alterações no crescimento e morfologia dos mesmos, foi realizada utilizando-se o *software* automatizado NeuroTrack IncuCyte ZOOM. Para isso foram plaqueadas a mesma quantidade de neurônios maduros (1,2x10^6/ml) das pacientes, da progenitora e um controle saudável (Tabela S1) e foram obtidas imagens a cada 30min por quatro dias.

O algoritmo NeuroTrack define automaticamente os corpos celulares e as extensões dos neuritos para calcular e quantificar o comprimento coletivo de neuritos por área de imagem, e avalia as seguintes medidas: área do corpo celular por imagem (*Cell body cluster*), comprimento dos neuritos (*Neurite length*), e pontos de ramificação (*Branch points*) ao longo do tempo total de quatro dias.

Análises estatísticas

Análise morfológica e eletrofisiológica

Foram aplicados testes não paramétricos (teste Man-Whitney) a fim de verificar se há diferenças entre os grupos caso e controle para as medidas de potencial de ação entre neurônios de pacientes e controles. O valor de significância adotado foi $p<0,05$. A análise foi realizada utilizando o *software* Prism5.

Análise de expressão de genes da diferenciação neural

A fim de verificar a existência de diferença de expressão de genes durante a diferenciação neural entre pacientes e controles *versus* tempo, foi utilizado a análise de regressão via árvores de acordo com (Hothorn *et al.* 2006). Tal modelo baseia-se em delimitar ramos da árvore de decisão de forma que consiga discriminar a variável de acordo com as características observadas. Para a realização deste modelo foi utilizado a linguagem de programação R (R Core Team 2019) e as bibliotecas *partykit* (Torsten.HothornR-project.org n.d.), *rpart* (Therneau e Atkinson 2018), *rpart.plot* (Milborrow, 2019) e *ggplot2* (Wickham 2016) para os gráficos, e o pacote *reshape* (Wickham 2007) para manipulação de dados. O valor de significância adotado foi $p<0,05$.

Análise da dinâmica de neuritos

A fim de verificar se há diferença entre pacientes e controles para as variáveis mensuradas (*cell body cluster*, *neurite legth* e *neurite branch*) através do software Incucyte

Neurotrack, foi realizado um modelo de regressão conforme proposto na literatura (Højsgaard 2006, Yan&Fine 2004, Yan 2002), que considera a dependência da variável tempo na análise. Para a realização deste modelo foi utilizado a linguagem de programação R (R Core Team 2019) e o pacote *geepack* para o modelo. O valor de significância adotado foi $p<0,05$. Análises realizadas por Msc. Frederico Monfardini, aluno de Doutorado da pós-graduação Interunidades de Bioinformática.

Resultados

Descrição Clínica

As duas irmãs incluídas neste estudo são fruto da gestação de um casal não consanguíneo. A primeira paciente (F6331-1) atendida pela primeira vez aos 6 anos de idade, nasceu por parto normal na 38ª semana com medidas antropométricas normais (apgar 10/10, peso 3990 g, tamanho 51 cm) (Figura 1A-B). Aos três meses de vida os pais perceberam que a criança apresentava baixo tônus muscular e fontanela ampla. Sentou e andou sem ajuda aos 12 e 32 meses respectivamente, e aos 24 meses falou as primeiras palavras. Aos três anos de idade foi diagnosticada com autismo e deficiência intelectual, e aos 7 anos de idade apresentou o primeiro episódio de surto psicótico. A avaliação médica aos 11 anos de idade revelou algumas dismorfias faciais: olhos profundos, ponte nasal proeminente, lábio superior tipo arco do cupido, palato alto, dentes espaçados, estreitamento bitemporal e *pads* fetais nas mãos. Além disso a paciente apresenta dislipidemia e hipotireoidismo. As imagens de ressonância magnética revelaram uma redução volumétrica e hipersinal em T2/FLAIR da substância branca periventricular (Material suplementar Figura 1). Eletrocardiograma e eletroencefalograma sem alterações. Atualmente, a paciente possui 14 anos de idade, estuda em uma escola especial, apresenta desatenção, falta de motivação para se engajar em atividades educacionais, e fala apenas algumas palavras e frases curtas.

A segunda paciente (F6331-4) avaliada pela primeira vez aos três anos de idade nasceu por meio de cesariana na 38ª semana de gestação com medidas antropométricas normais (Apgar scores: 8/9, peso 3850 g, tamanho 48 cm) (Figura 1A-B). Sentou sem apoio aos 6 meses de vida e andou aos 14 meses. Aos 12 meses, foi diagnosticada com autismo e atraso global do desenvolvimento. Começou a falar com aproximadamente 1 ano. Aos 4

anos de idade, apresentou o primeiro episódio de crise convulsiva prolongada e de difícil controle, que posteriormente foi diagnosticada como epilepsia focal generalizada. A avaliação clínica realizada aos 7 anos revelou presença de características dismórficas semelhantes as da Paciente 1, e dislipidemia e hipotireoidismo; além das características já mencionadas, diferentemente de sua irmã ela apresenta braquidactilia do 5º artelho e 4º artelho e unhas hipoplásicas nos dedos do pé. Atualmente, possui 10 anos e apresenta fraqueza progressiva em seus membros inferiores, notada pela primeira vez aproximadamente aos 8 anos de idade. As imagens de ressonância magnética também revelaram uma redução volumétrica e hipersinal em T2/FLAIR da substância branca periventricular (Material suplementar Figura 1). O Eletroencefalograma apresentou uma formação lenta, bilateral e desorganizada com descargas epiletiformes multifocais, que confirmam o quadro epilético. O eletrocardiograma não apresentou alterações.

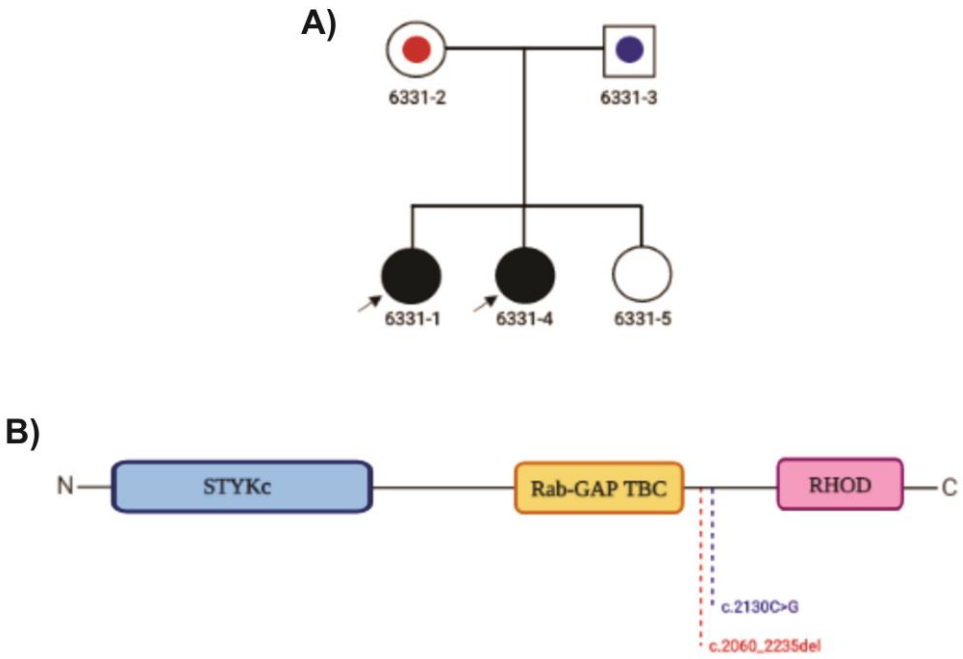


Figura 1. Diagrama das variantes em *TBCK* reportadas no presente estudo. A) Heredograma família 6331; B) Diagrama dos domínios conhecidos em TBCK e a localização das variantes descritas no estudo.

Células neurais derivadas de iPSC expressam marcadores típicos da diferenciação neuronal

Células neurais derivadas de iPSC foram utilizadas para análise do efeito de mutações em *TBCK*. Dado que a patofisiologia de IHPRF3 pode decorrer de distúrbios durantes as diferentes etapas da neurogênese embrionária, e portanto o protocolo utilizado é capaz de gerar tipos celulares representativos de estágios sequenciais e específicos do

desenvolvimento neuronal humano, sendo eles: iPSC, NSC, neurônios imaturos (<45 dias) e neurônios maduros (>60 dias) (Figura 2). Os níveis de expressão dos marcadores específicos para IPSCs (*OCT4*), NSCs (*PAX6*, *SOX1*) e neurônios (*CUX1*, *MAP2* e *Tbr1*) apresentaram resultados dentro do esperado para o tipo celular observado nos controles (Figura 2, 3A-B). Nas células das pacientes, exceto para o marcador *Tbr1* e *MAP2*, específicos de neurônios, todos os marcadores apresentaram o padrão típico do tipo celular analisado (Figura 3B). *MAP2* é responsável por codificar uma proteína pertencente à família de proteínas associadas ao microtúbulo, a qual atua na regulação da dinâmica dos microtúbulos em neurônios (Melková *et al.* 2018). A expressão de *MAP2* ocorre principalmente em neurônios com maior tempo de maturação, assim como observado para os controles. Durante a diferenciação nas pacientes, observa-se que há expressão de *MAP2* já no estágio de NSC. O gene *Tbr1* codifica um fator de transcrição neuronal da família T-Box, e está altamente expresso no córtex onde atua no desenvolvimento das projeções neuronais, e, portanto é expresso principalmente em neurônios maduros (Notwell *et al.* 2016). Durante o processo de diferenciação nas células de pacientes, a expressão de *Tbr1* possui um decaimento drástico em relação aos controles a partir do nível de NSC, o qual será comentado com mais detalhes posteriormente.

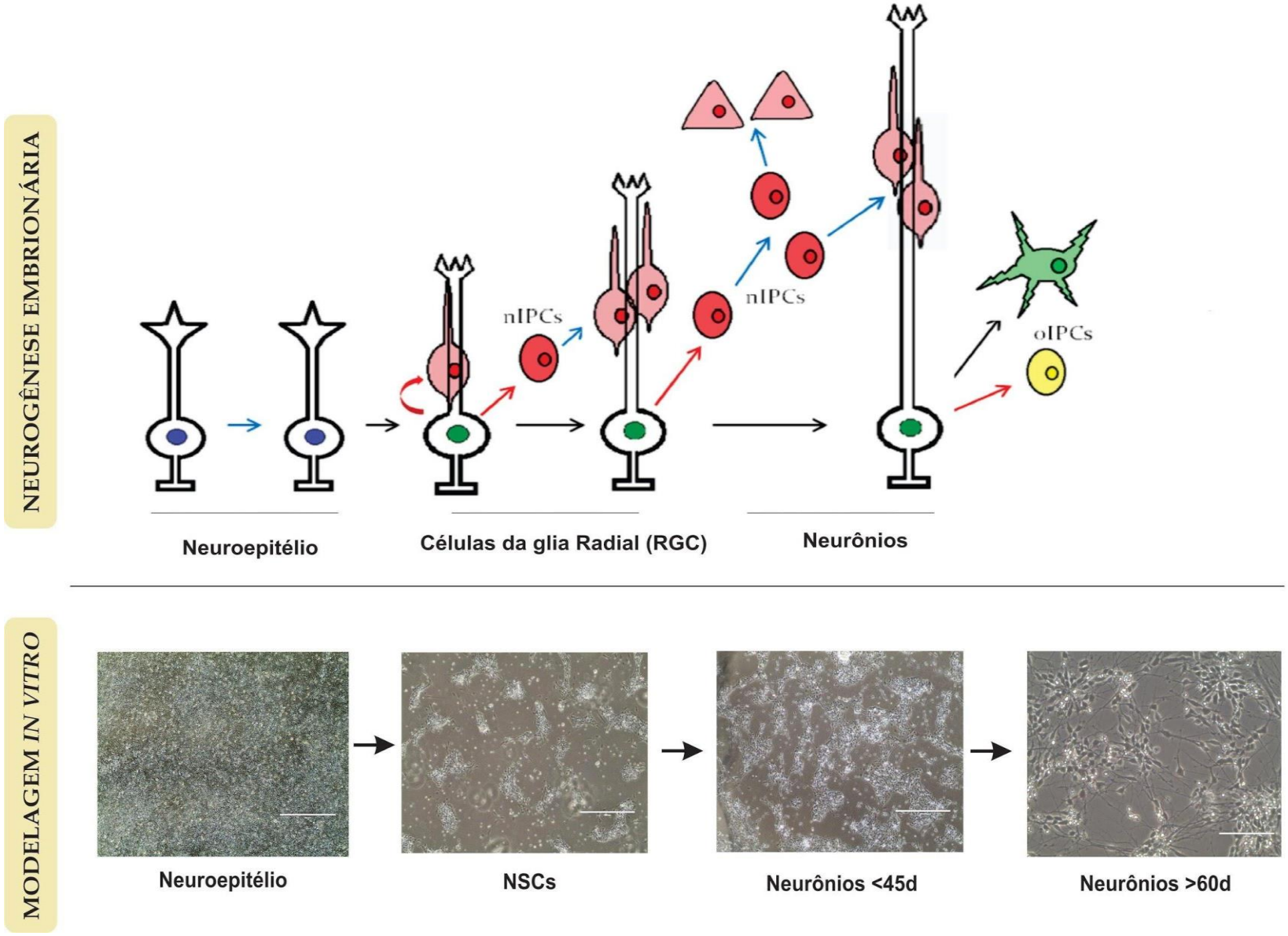


Figura 2. Neurogênese embrionária e a modelagem *in vitro* utilizando iPSC (Adaptado de Mitrousis *et al.* 202015). A neurogênese no embrião se inicia após as células ectodérmicas assumirem uma identidade neuroepitelial, que subsequentemente diferencia-se em células da glia radial (RGCs) as quais darão origem a neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Na diferenciação *in vitro* a partir de iPSC, após a indução neural, as células passam pelo estágio de neuroepitélio, NSCs (semelhante a RGCs), neurônios imaturos e maduros.

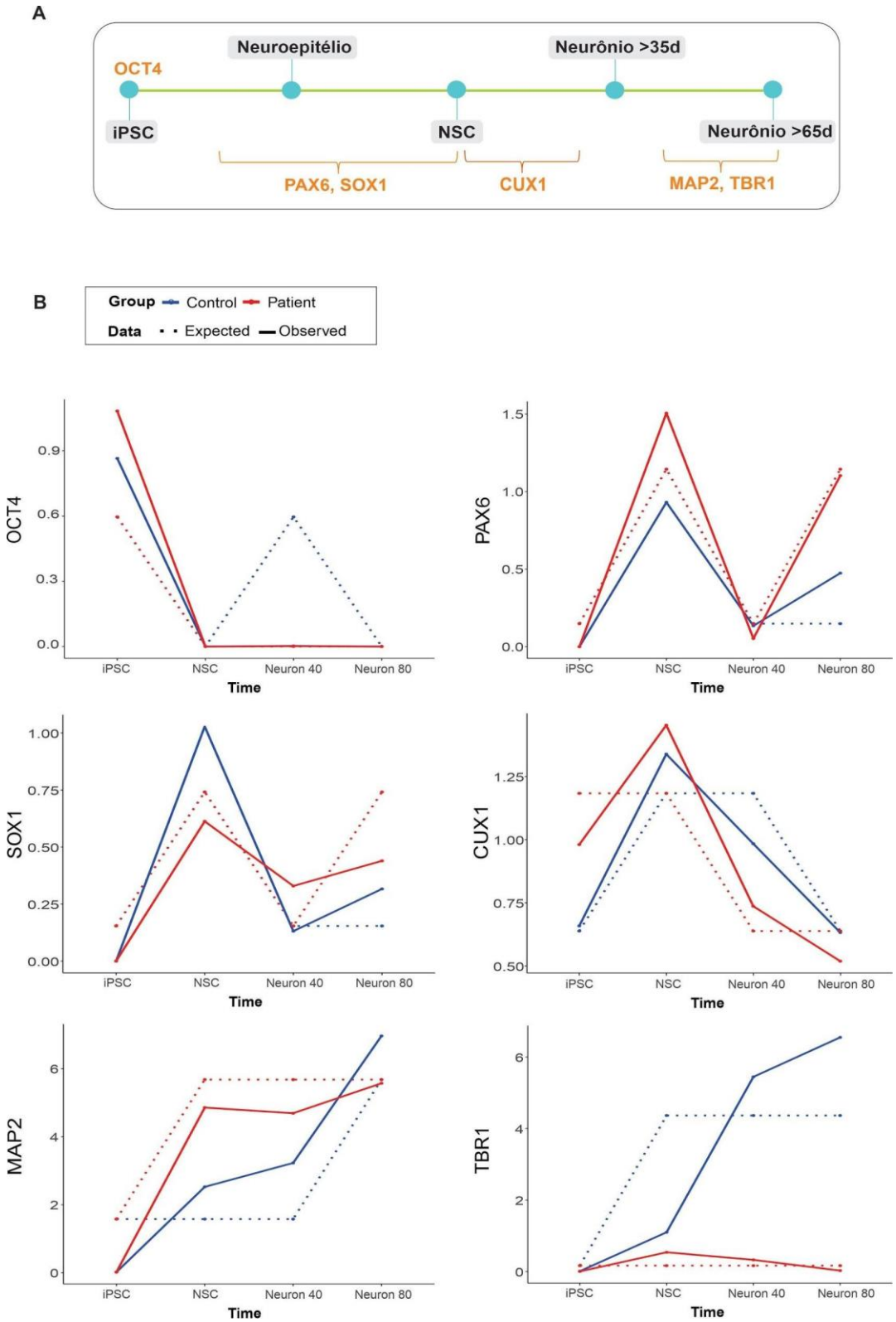


Figura 2. Expressão Relativa dos níveis de mRNA de marcadores da diferenciação neural. (A) Esquema das diferentes etapas da diferenciação neuronal do protocolo utilizado e os marcadores específicos de cada estágio; (B) Os níveis de expressão relativa dos marcadores *OCT4*, *PAX6*, *SOX1*, *CUX1*, *MAP2* e TBR1 foram analisados utilizando o modelo estatístico de árvore de decisão. Em vermelho, na linha contínua observa-se os valores de expressão analisados para amostras de pacientes, já a linha vermelha tracejada representa os valores esperados de acordo com o modelo de árvore de decisão. Em azul, a linha contínua representa os valores de expressão analisados para amostras de controles, já a linha vermelha tracejada representa os valores esperados de acordo com o modelo de árvore de decisão.

Os resultados analisados por imunofluorescência através de marcações positivas para *Tuj1*, *MAP2* e *Syn*1 (marcadores neuronais) (Figura 3A-C), foram também de acordo com o tipo celular analisado. Apesar das imagens obtidas dos neurônios das pacientes apresentarem uma menor quantidade de células em relação aos controles, a mesma não foi avaliada com mais detalhes, e, portanto, serão necessárias novas análises para confirmar esta diferença.

Desta forma, os resultados confirmaram que as células de pacientes e de controles possuem perfis de células tronco pluripotentes e neurais, e que a desregulação de *Tbr1* e o perfil de expressão de *MAP2* alterado durante a diferenciação poderia estar relacionada com a patofisiologia da doença e não com um problema do protocolo de diferenciação.

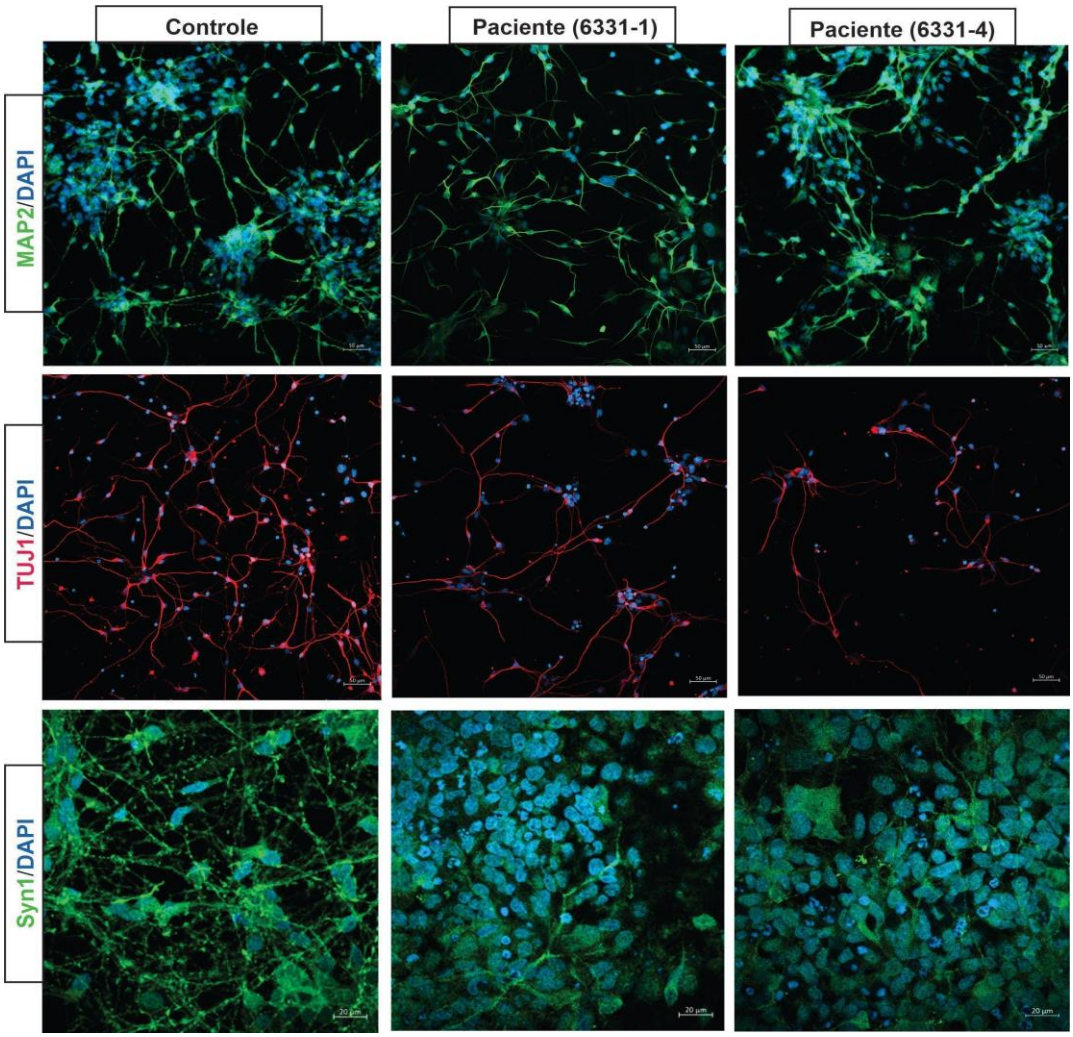


Figura 3. Análise imunofluorescência de neurônios diferenciados a partir de iPSC. A partir de 60 dias de diferenciação, as células expressam (A) MAP2 (verde) ao longo do soma e dendritos. Barra de escala: 50um; (B) TUJ1 (vermelho) ao longo do soma e dendritos. Barra de escala 50um; (C) e Syn1 (verde) ao longo de todo o corpo neural. Barra de escala: 20um

Expressão e localização de *TBCK* em células neurais

A expressão de *TBCK* foi analisada em NSCs e Neurônios de pacientes e controles.

Foi observado que a expressão de mRNA de *TBCK* é significantemente reduzida nas NSCs de pacientes em relação aos controles (Pacientes: $\bar{x}$=2,044, sd=0,93; Controles: $\bar{x}$=3,827, sd=0,34; p<0,01) (Figura 4A), o que não foi observado em estágios posteriores do processo de diferenciação (neurônios maduros) (Pacientes: $\bar{x}$=2,066, sd=0.95; Controles: $\bar{x}$=1,651, sd=0,52; p=0,3943) (Figura 4A).

Dado que não observamos redução de expressão de *TBCK* em neurônios maduros, nós avaliamos a distribuição de *TBCK* em neurônios de controles e pacientes, por meio da técnica de imunofluorescência. Observa-se que *TBCK* está distribuído em todo corpo neural e não foi observada nenhuma diferença em relação a distribuição de *TBCK* entre neurônios de pacientes e controles (Figura 4B).

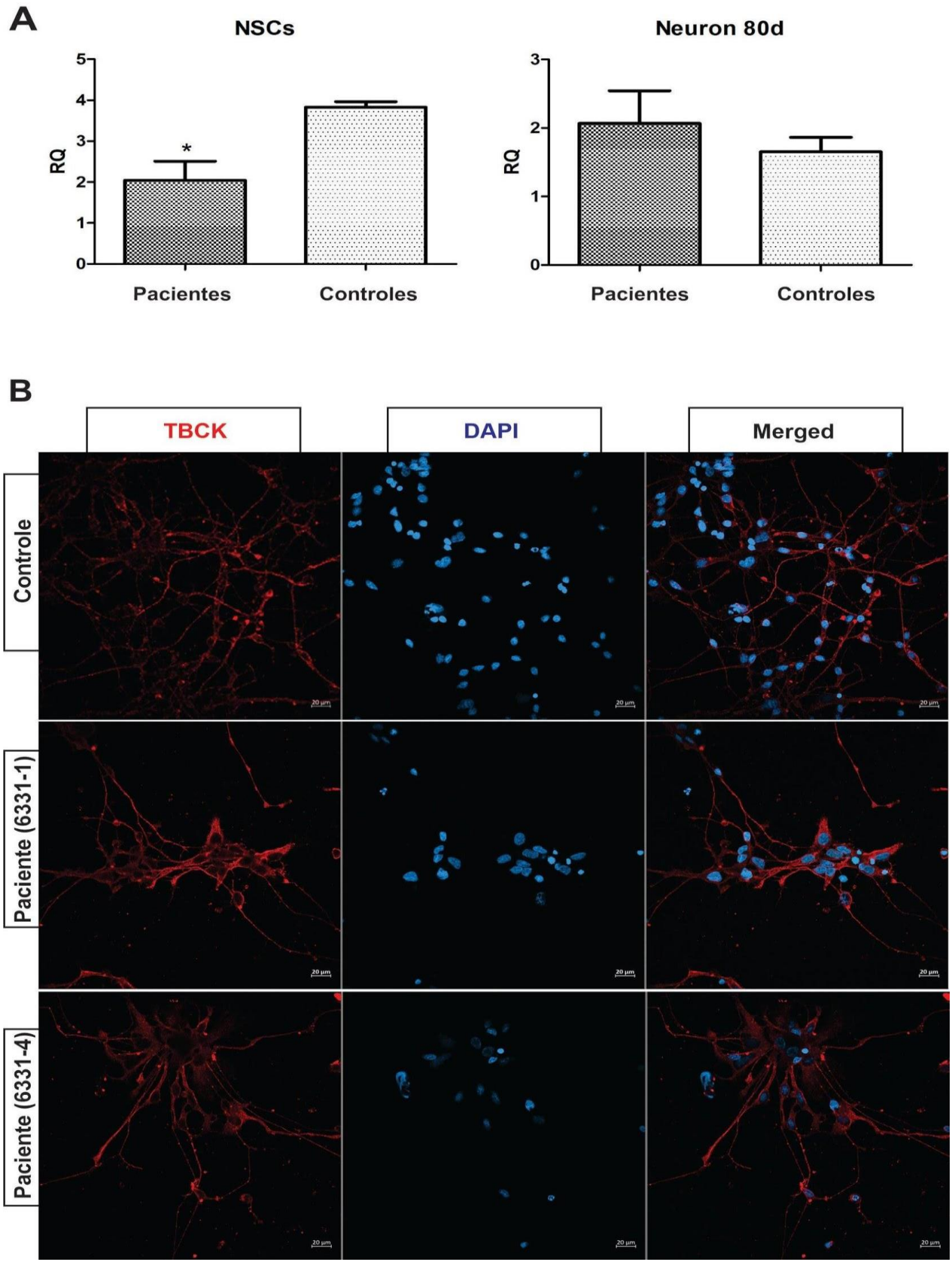


Figura 4. Localização e expressão de *TBCK* em células neurais. (A) Expressão relativa de mRNAs de *TBCK* em NSCs significamente reduzidas nas células de pacientes, e com níveis de expressão semelhantes entre neurônios de pacientes e controles. B) Neurônios com 60 dias de diferenciação expressam TBCK (vermelho) ao longo do soma e dendritos tanto em células de controles assim como pacientes. Barra de escala: 20um.

Neurônios obtidos *in vitro* apresentam potenciais de ação

Após termos confirmado a expressão de marcadores específicos da diferenciação neuronal nos neurônios diferenciados a partir de iPSC, nós avaliamos se os mesmo seriam capazes de gerar potenciais de ação e seriam funcionais, utilizando a técnica de *Patch-Clamp*. A caracterização eletrofisiológica dos neurônios obtidos *in vitro* realizada ao longo da diferenciação neuronal revelou que os neurônios de pacientes (n=2) e controles (n=3) apresentam potenciais de membrana em repouso (RMP) com valores em torno de -30mV, de acordo com o esperado para neurônios funcionais (Figura 5G). Além disso, os valores de diversas propriedades eletrofisiológicas da membrana, como os valores de MTC (*membrane time constant*) (Figura 5F), limiar (*threshold*) (Figura 5H) e os tempos de subida e decaimento dos potenciais de ação (APs *decay time e rise*) (Figura 5D-E) apresentam valores semelhantes entre pacientes e controles.

Por outro lado, foi observada que para as medidas amplitude dos APs (Paciente: $\bar{x}$=23,88mV, sd=6,326; Controle: $\bar{x}$=49,17mV, sd=18,99; p<0,0001), largura de APs (Paciente: $\bar{x}$=6,768ms, sd=3,322; Controle: $\bar{x}$=3,883ms, sd=1,176; p<0,05) e número de correntes necessária para o disparo dos primeiros APs (Paciente: $\bar{x}$=43,75pA, sd=19,67; Controle: $\bar{x}$=21,00pA, sd=19,55; p<0,05), (figure 5A-C) é significantemente diferente entre controles e pacientes. De acordo com os registros de APs, o perfil de resposta dos neurônios dos pacientes não foi homogêneo entre as mesmas, porém de maneira geral diferem das amostras de controles (Figura 5I – Vermelho; Figura S3). De acordo com estes dados, sugere-se que os neurônios das pacientes seriam mais excitáveis, e diferem do perfil de resposta dos controles.

Portanto, de maneira geral os dados obtidos com este experimento sugerem que os neurônios diferenciados a partir de iPSC em cultura, de pacientes e controles, são funcionais e possuem propriedades eletrofisiológicas esperadas para células neuronais, porém diferem entre os dois grupos.

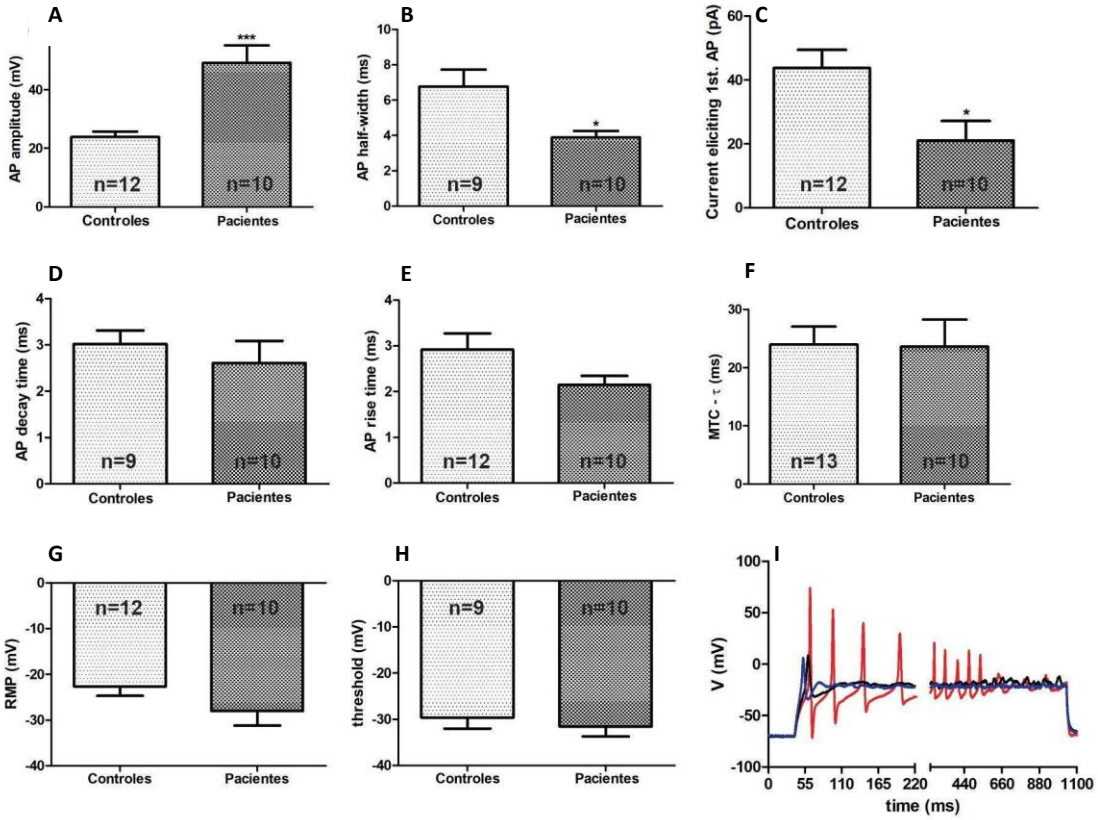


Figura 5. Análise de propriedades eletrofisiológicas de neurônios diferenciados a partir de iPSC. O número de células examinadas para este experimento é mostrado dentro da barra dos gráficos a seguir. (A) Amplitude do potencial de ação (AP) entre neurônios de pacientes e controles; (B) Altura e largura do potencial de ação de neurônios de pacientes e controles; (C) Número de correntes necessárias para que os neurônios disparassem potencial de ação; (D) Tempo de decaimento do potencial de ação entre os neurônios; (E) Tempo para que os neurônios disparassem o AP; (F) Constante de membrana de neurônios de pacientes e controles; (G) Potencial médio da membrana em repouso; (H) Limiar de AP de neurônios de pacientes e controles; (I) APs representativos em resposta a injeções de corrente em neurônios de pacientes (6331-1 – vermelho; 6331-4 – azul) e controles (preto) com 60 dias de diferenciação.

Mutações em *TBCK* não alteram o nível de senescência neural

De acordo com os dados de eletrofisiologia, os neurônios das pacientes possuem um perfil de resposta semelhante a neurônios com maior tempo de maturação. Diante deste resultado optamos por avaliar se os neurônios de pacientes envelheceriam precocemente em relação a controles. Portanto, foram avaliados o nível de senescência das células neuronais com os níveis de expressão de p16, uma proteína que desempenha um papel importante na regulação do ciclo celular, nas célula neuronais de pacientes e controles. Apesar de as amostras dos neurônios das pacientes apresentarem uma tendência a menor expressão (Material suplementar Figura S3), não houve diferença significativa em relação a expressão de p16, sugerindo que os neurônios de pacientes e controles apresentam níveis de senescência semelhantes.

Neurônios TBCK-mutantes apresentam acúmulo de proteínas pré-sinápticas no soma neural

Utilizando-se os marcadores específicos de células neuronais para caracterização dos neurônios diferenciados a partir de iPSC, observamos que as amostras das pacientes apresentam um padrão de distribuição do marcador de vesículas pré-sinápticas Synapsin 1 (Syn1) diferente dos controles. Observou-se que nos neurônios das pacientes a *Syn1* apresentam maior acúmulo na região do soma neural em relação aos controles, nos quais a expressão de *Syn1* está distribuída ao longo dos neuritos. Esse resultado sugere que é possível que haja uma alteração na transmissão sináptica nos neurônios de pacientes (Figura 6).

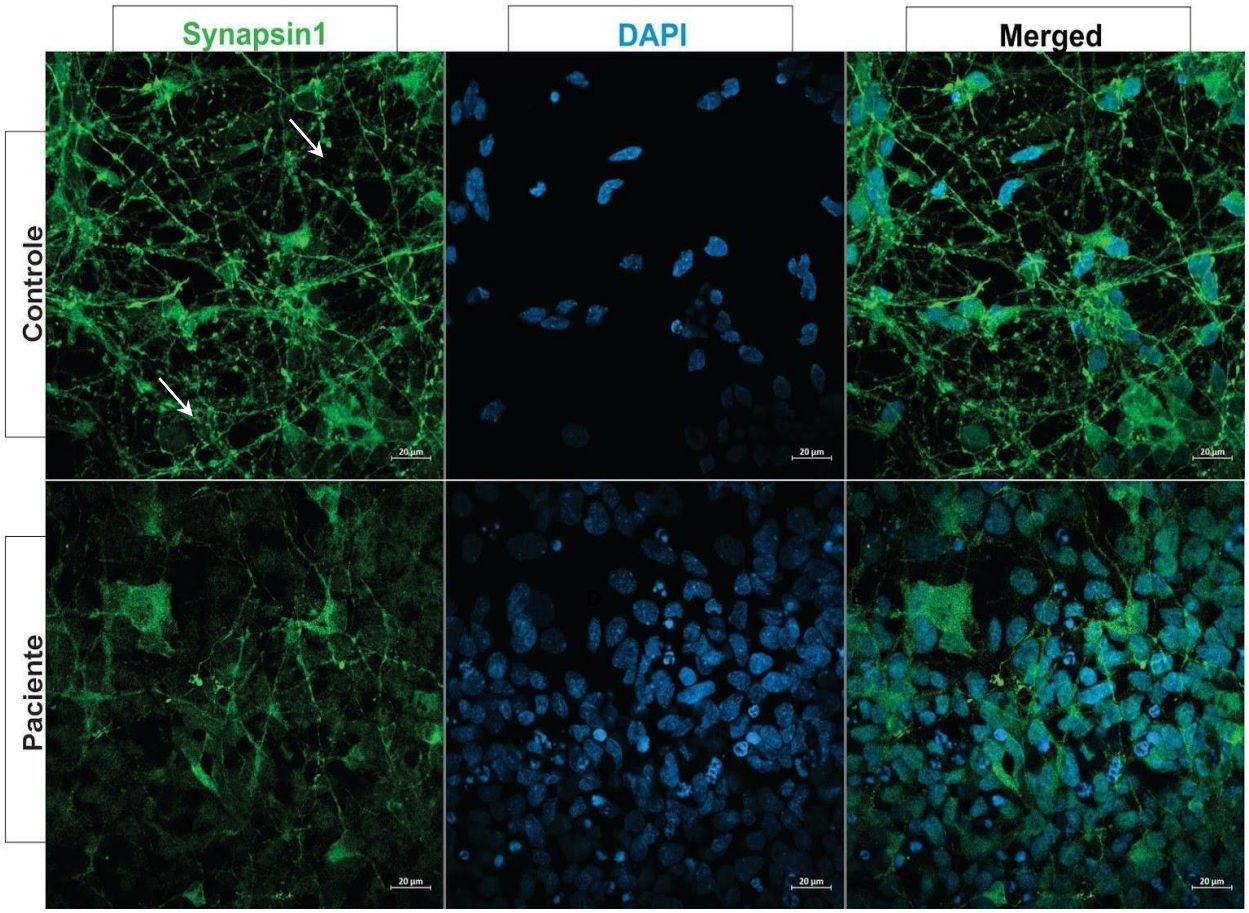


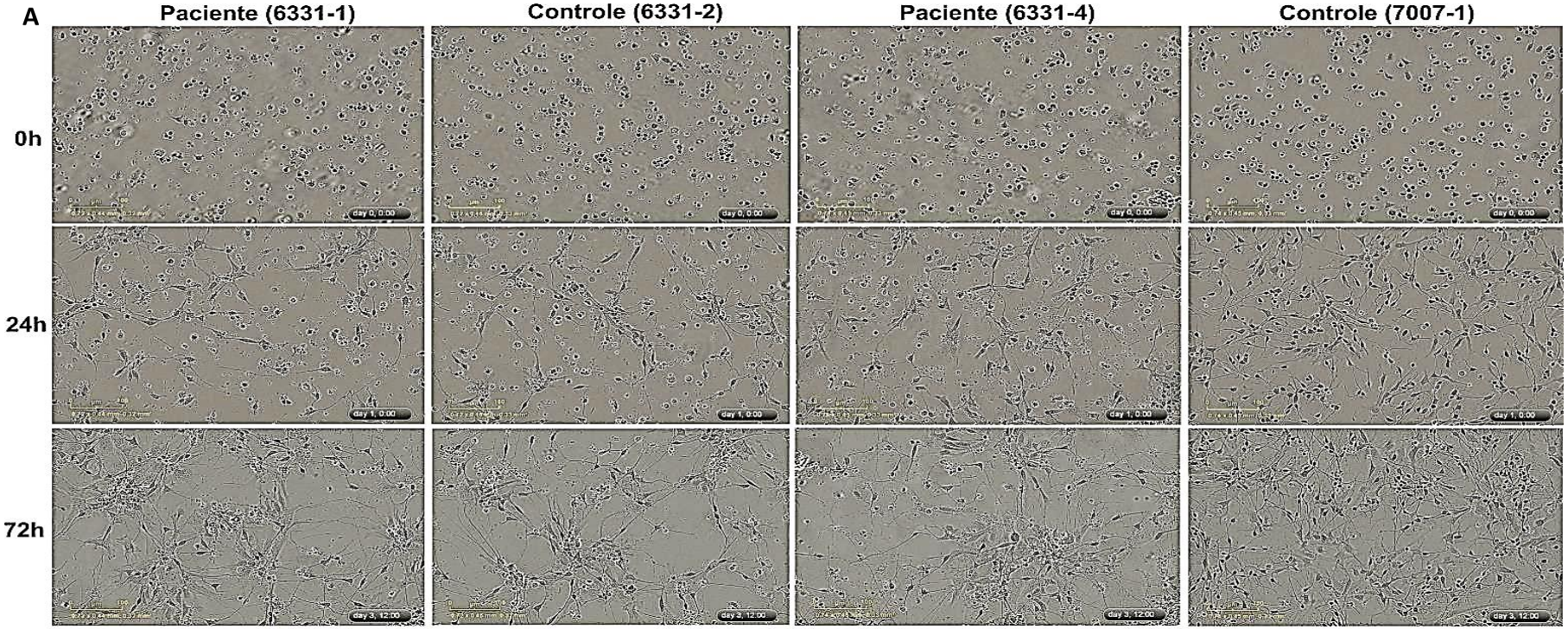
Figura 6. Análises morfológicas dos neurônios diferenciados a partir de iPSC utilizando imunofluorescência. (A) Neurônios com 60 dias de diferenciação expressam Tuj1 (vermelho). Barra de escala: 50um; (B) Tamanho estimado do total dos neuritos de pacientes e controles calculado através das marcações positivas para Tuj1 (Pixels); (C) Número de ramificações dendríticas; (D) Número de dendritos (attachment points) por soma; (E) Número de dendritos por ramificações finais; (F) Neurônios com 60 dias de diferenciação expressam Synapsin 1 (marcador de vesículas pré-sinápticas). Barra de escala: 20um.

Mutações patogênicas em *TBCK* levam ao aumento do tamanho do soma neural

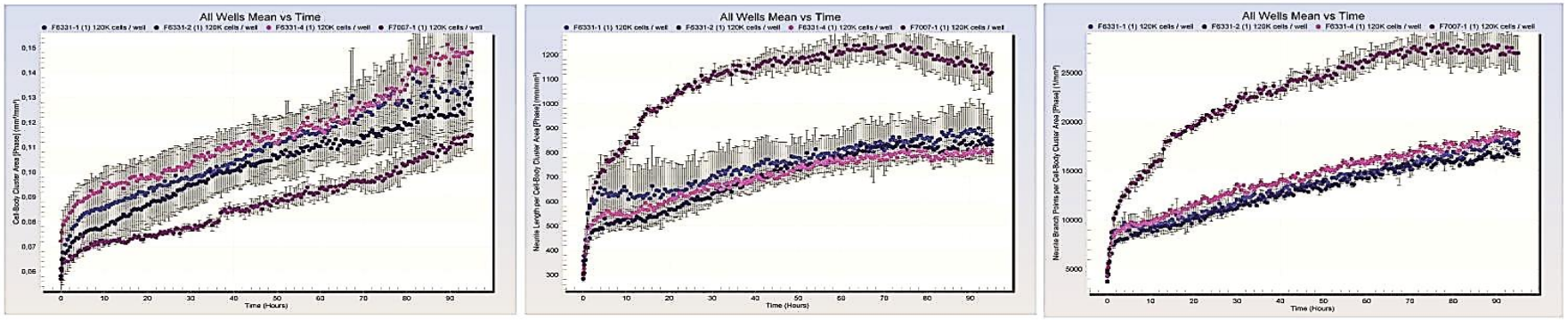
Para a análise da dinâmica de formação de neuritos, além das amostras de pacientes e da progenitora, utilizamos mais um controle. As análises mostraram que em relação aos parâmetros número de ramificações de neuritos e o tamanho dos neuritos em geral, as amostras das pacientes foram semelhantes às da progenitora e diferente do controle não aparentado. Portanto, apesar das amostras das pacientes apresentarem uma tendência a valores menores (tamanho de neuritos e número de ramificações) comparados ao controle não aparentado, não foi possível obter um resultado que fosse conclusivo para estes parâmetros. Neste sentido, posteriormente o experimento deverá ser repetido com mais amostras de controles não aparentados. (Figura 7B-C).

As amostras de pacientes foram diferentes em relação a da progenitora e ao controle para a medida da área total do soma neural. De acordo com os resultados nos neurônios de pacientes o corpo celular é 17.518% maior do que neurônios dos controles em média (valor p=0,003) (Figura 7A).

A



B



C

Medida	Coeficiente	Contribuição	p valor
Cell_body_cluster_area	0,161	17,518%	0,003
Cell_body_cluster_numberperplate	-0,188	-17,134%	0,208
Neurite_branch_per_CellBodyArea	-0,208	-18,754%	0,254
Neurite_lenght_per_CellBodyArea	-0,157	-14,523%	0,218

Figura 7. Análise da dinâmica de formação dos neuritos. (A) Imagens representativas dos tempos 0h, 24h e 48h obtidas com Incucyte em cultura; (B) Medida da área do corpo celular dos neurônio de pacientes (lilás e azul), da mãe (preto) e controle (roxo); Medida do número de neuritos por soma de pacientes (lilás e azul), da mãe (preto) e controle (roxo); Medida do tamanho de neuritos por soma de paciente (lilás e azul), da mãe (preto) e controle (roxo); (C) Resumo dos resultados obtidos e valores estatísticos.

Mutações em *TBCK* alteram a cascata de diferenciação da neurogênese glutamatérgica

Como mencionado anteriormente, nós observamos que as células neurais de pacientes apresentavam uma diminuição drástica em relação aos níveis de *Tbr1* comparadas aos controles (Figura 2B). Além disso, ao longo dos diferentes tempos de diferenciação (iPSC, NSC, neurônio imaturo e neurônio maduro), a expressão de *SOX1* e *PAX6* se mantiveram elevadas em neurônios maduros de pacientes (Figura 2B).

A fim de confirmar a hipótese de que as amostras de neurônios de pacientes possuíam uma alteração na cascata de fatores de transcrição da neurogênese glutamatérgica (PAX6 → Tbr2 → Tbr1), nós analisamos a expressão dos genes *SOX1*, *PAX6 e Tbr2* em neurônios maduros. Os níveis de expressão de *SOX1* e *PAX6* apresentam uma tendência a maior expressão nos neurônios de pacientes, enquanto a expressão de *Tbr2* está diminuída (Pacientes: $\bar{x}$=0,008, sd=0,0004; Controles: $\bar{x}$=0,030, sd=0,0074; p<0,05) (Figura 8A-B).

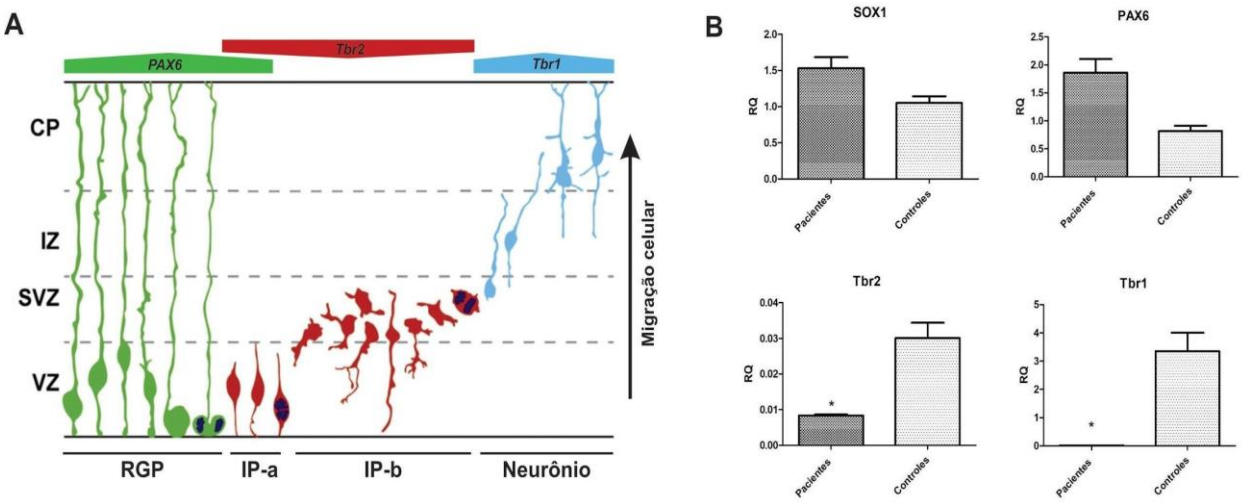


Figura 8. Neurônios de pacientes com mutações patogênicas em *TBCK* possuem expressão alterada dos fatores de transcrição da cascata da neurogênese glutamatérgica cortical. (A) A expressão dos fatores de transcrição se correlaciona com as transições entre os tipos de células, como sugerido pelas barras que indicam os níveis de expressão dos fatores de transcrição da cascata da neurogênese glutamatérgica (Adaptado de Mihalas et al. 2017); (B) Expressão relativa dos níveis de mRNA de SOX1, PAX6, Tbr2 e Tbr1 em neurônios com ~80 dias de diferenciação.

Análise de expressão de genes regulados por *Tbr1*

Nossos resultados mostram que a expressão de *Tbr1* estaria drasticamente diminuída na amostra de neurônios de pacientes. Diversos estudos mostram que o *Tbr1* atua como ativador ou repressor de genes que estão expressos durante o desenvolvimento cortical (Notwell et al. 2016). Sendo assim, nós avaliamos o nível de expressão dos principais genes regulados por *Tbr1* que atuam no desenvolvimento neural: *RELN*, *Fezf2* e *BCL11B*. Os níveis de expressão foram avaliados em dois tempos de diferenciação: em neurônios imaturos (Neuron 40) e neurônios maduros (Neuron 80).

Os níveis de expressão de todos os marcadores estiveram claramente diminuídos nas células neuronais de pacientes em relação aos controles na fase de neurônio imaturo. No entanto, em neurônios maduros a expressão reduzida foi observada para *Tbr1*, *Fezf2* e *BCL11B* em relação aos controles, enquanto *RELN* não mostrou um padrão diferente entre os dois grupos. Esses resultados mostram que a expressão dos genes regulados pelo *Tbr1* está também alterada. Tais dados são consistentes com o papel do *Tbr1* como regulador transcricional direto de genes relacionados ao desenvolvimento do neocórtex, os quais já foram associados a doenças do neurodesenvolvimento, como autismo e deficiência intelectual (Figura 9).

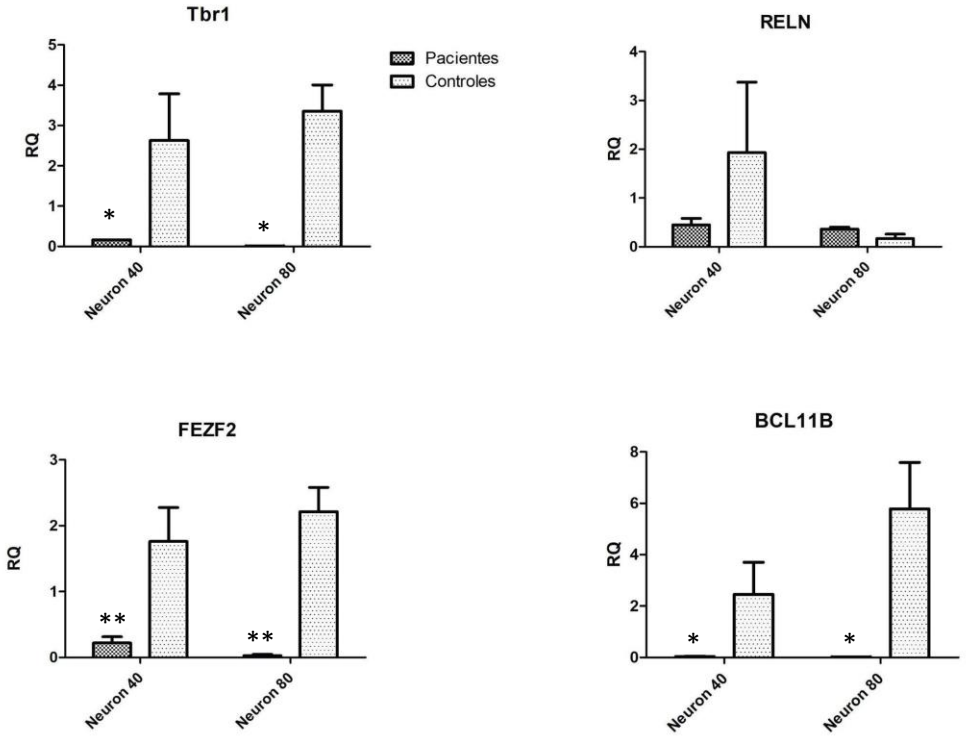


Figura 9. Neurônios de pacientes com mutações patogênicas em *TBCK* apresentam alteração na expressão de genes associados ao TEA e DI. Expressão relativa dos níveis de mRNA de *Tbr1 (p<0,05)*, *RELN (p>0,05)*, *FEZF2 (p<0,01)* e *BCL11B (p<0,05)*.

Discussão

No presente estudo realizamos a caracterização de células neurais de duas pacientes que apresentam mutações bi-alélicas no gene *TBCK* e características clínicas como encefalopatia, atraso no desenvolvimento e epilepsia, que são compatíveis com o diagnóstico de IHPRF3. Além disso, características como autismo, dislipidemia e hipotireoidismo presentes nessas duas pacientes, foram pouco reportadas até o momento (Bhoj et al. 2016). A análise das imagens de exames neurológicos das duas pacientes revelou que há um hipersinal da substância branca e uma redução volumétrica, os quais são sugestivos de um possível quadro de neurodegeneração, achados como estes também foram descritos em outros casos da literatura (Ortiz-González et al. 2018; Zapata-Aldana et al. 2019). As variantes patogênicas aqui descritas, c.2130C> G e c.2060_2235del, estão localizadas entre os domínios TBC Rab GAP e RHOD. Dentre os 37 casos descritos, apenas em um caso apresenta variante nessa região entre estes dois dominios, enquanto nos casos restantes, as variantes patogênicas de *TBCK* estão localizadas em um dos dois primeiros domínios da proteína, os domínios quinase e TBC Rab GAP. (Bhoj et al. 2016; Sumathipala et al. 2019).

O presente estudo é o primeiro a caracterizar neurônios corticais com mutações patogênicas em *TBCK*. Os neurônios foram gerados a partir de iPSCs utilizando um protocolo que se baseia na inibição de ambas as vias de sinalização de TGF-b, o qual foi padronizado e devidamente adaptado no presente trabalho (Shi et al. 2012; Handel et al. 2016; Nadadhur et al. 2018). A diferenciação de neurônios a partir de iPSC utilizando o protocolo padronizado recapitula o desenvolvimento do córtex cerebral humano, e portanto possui a capacidade de modelar doenças do neurodesenvolvimento e neurodegenerativas, como a IHPRF3 (Shi *et al.* 2012). As caracterizações neuronais com marcadores para o tipo celular de interesse mostraram que os neurônios obtidos *in vitro* apresentam expressão de marcadores típicos da diferenciação neuronal. Além disso, em geral não foi observada diferença em relação ao processo de diferenciação neuronal a partir de células somáticas de pacientes e controles, exceto para os marcadores *Tbr1* e *MAP2* que serão discutidos posteriormente. A marcação positiva de *TBCK* esteve presente tanto em neurônios de controles como de pacientes de maneira homogênea. Observa-se, no entanto que os níveis de *TBCK* nas NSCs estavam diminuídos em relação aos controles, porém esta diferença não foi observada nos neurônios. Tal dado pode ser sugestivo de que somente as NSCs com expressão de *TBCK* são viáveis e permanecem no processo de diferenciação em neurônios.

De maneira geral, os neurônios de pacientes e controles apresentaram a maioria dos parâmetros eletrofisiológicos semelhantes, e dentro do esperado para neurônios derivados a partir de iPSC de acordo com dados da literatura (Prè *et al.* 2014). Esses resultados sugerem, portanto, que os neurônios obtidos em diferenciação são funcionais. Contudo, observamos os valores obtidos de amplitude de AP, largura e altura de AP, e número de correntes necessárias para o disparo foram maiores em pacientes do que em controles. Esses resultados seriam sugestivos de que os neurônios de pacientes com IHPRF3 seriam mais excitáveis, no entanto, de maneira individualizada os dados obtidos não foram homogêneos entre as amostras das pacientes, o que pode representar um achado casual. O nível de senescência nos neurônios de pacientes e controles avaliados pela expressão de p16 possuem valores semelhantes. Portanto mais amostras e outros marcadores de senescência deverão ser incluídos a fim de obter um resultado mais conclusivo.

Utilizando neurônios diferenciados a partir de iPSC, nós observamos que neurônios de pacientes com IHPRF3 possuem algumas alterações morfológicas. Tais alterações podem estar relacionadas a uma desregulação no processo de diferenciação e a maturação precoce, que levariam ao fenótipo clínico de neurodegeneração observado nas pacientes com IHPRF3. Até o momento, mutações deletérias em dois genes da família Tre2-Bub2-Cdc16 (TBC) têm sido implicados em distúrbios do desenvolvimento cerebral: *TBC1D23* (#MIM: 617687), associada a hipoplasia ponto-cerebelar do tipo 11 e *TBC1D24* (#MIM: 613577), responsável por ocasionar a epilepsia mioclônica infantil focal e familiar. Os estudos funcionais demonstraram que a morfologia de neurônios mutados para tais genes também apresentam alterações morfológicas neuronais como a diminuição do tamanho e complexidade dos prolongamentos de neuritos (Finelli *et al.* 2019; Aprile *et al.* 2019; Ivanova *et al*. 2017; Marin-Valencia *et al.* 2017). No presente trabalho, observamos que apesar da progenitora das pacientes não apresentar nenhum fenótipo clínico da síndrome, na análise da dinâmica de formação de neuritos, os neurônios da mesma apresentaram algumas características semelhantes a das pacientes e diferentes de controles. Por outro lado, as pacientes apresentam um aumento em relação ao tamanho do soma comparado a progenitora e ao controle. Esses dados, se confirmados, serão importantes para entender quais as alterações *in vitro* que podem ser significativas para o fenótipo do indivíduo. Nota-se que até o momento, não há nenhum relato na literatura sobre o fenótipo de indivíduos heterozigotos para mutações em *TBCK*.

O acúmulo de sinapsina, na região do soma neural das células neuronais dos pacientes pode ser um indicativo da disfunção de vias relacionadas a degradação de proteínas (Boecker and Holzbaur 2019; Parra-Damas and Saura 2019). Estudos recentes sugerem que mutações no gene *TBCK* levam a uma disfunção autofagolisossômica, a qual pode ser ocasionada por dois principais mecanismos: o acúmulo na formação do autofagossomo mediadas por mTOR ou a fusão reduzida do autofagossomo-lisossomo mediada por Rab (Ortiz-González et al. 2018; Beck-Wödl et al. 2018). Além disso, os resultados preliminares obtidos em nosso laboratório demonstram que NPCs de pacientes com IHPRF3, apresentam alteração no tráfego de vesículas no sentido de Retículo Endoplasmático-Golgi (Moreira & Suzuki 2019, em preparação). Os neurônios são altamente dependentes das vias de degradação intracelular para evitar que ocorra o acúmulo de organelas e proteínas não-funcionais (Liang 2019; Boecker and Holzbaur 2019). A perda de função em genes relacionados a qualquer das vias neurais de degradação proteica, seja autofágica ou endolisossomal, resulta em agregação de proteínas e pode levar a neurodegeneração (Liang 2019; Parra-Damas and Saura 2019; Menzies *et al.* 2015). A análise *in vivo* de cérebros *post mortem* de pacientes com IHPRF3, mostra que os neurônios destes pacientes possuem um acúmulo de substâncias na região do soma neural e um alto nível de gliose (Beck-Wödl *et al.* 2018). Sendo assim, os neurônios das pacientes apresentariam um acúmulo de proteínas pré-sinápticas devido a uma falha no processo de tráfego de vesículas, e este acúmulo pode estar relacionado ao aumento do tamanho do soma neural observado nos neurônios das pacientes. Para confirmarmos esta hipótese é necessária a realização de experimentos adicionais.

Além dos dados morfológicos e eletrofisiológicos, a análise de expressão de genes envolvidos no processo de diferenciação neural demonstra que as células com mutações bi-alélicas em *TBCK* possuem uma alteração da expressão de *MAP2* e *Tbr1*. A expressão de *MAP2* em neurônios controles diferenciados a partir de iPSC aumenta de acordo com tempo de maturação (Shi *et al.* 2012; Handel *et al.* 2016), porém durante a diferenciação neuronal em células de pacientes observa-se que há um pico de expressão logo em NSCs. O aumento da expressão de *MAP2* logo no início da diferenciação neural nas amostras de pacientes pode estar relacionado a um processo de maturação precoce. Recentemente, demonstrou-se que o tempo de diferenciação neuronal em células de indivíduos com TEA equivale a estágios de diferenciação mais avançados em controles, e o período crítico para esta diferença é iniciada durante o estágio pré-neural de NSC, resultado semelhante ao

observado nas células das pacientes (Schafer *et al.* 2019). Os neurônios das pacientes com IHPRF3 apresentaram ainda uma diminuição drástica dos níveis de expressão de *Tbr2* e *Tbr1* e um aumento em relação a expressão de *PAX6* em neurônios quando comparadas a controles. O desenvolvimento do córtex cerebral é regulado por fatores genéticos que dão origem a diversas áreas corticais, camadas e subtipos neurais com perfis distintos de expressão gênica (Mihalas and Hevner 2017). Em cada tipo celular, o perfil de expressão gênica é determinado por uma combinação de fatores de transcrição que se ligam a sequências de DNA específicas para ativar ou reprimir a transcrição (Elsen *et al.* 2018). Entre os mais importantes fatores de transcrição do desenvolvimento cortical, estão os da cascata de ativação *PAX6* → *Tbr2* → *Tbr1* (Mihalas and Hevner 2017; Elsen *et al.* 2018). Inicialmente, durante o desenvolvimento embrionário, o gene *PAX6* é expresso na placa neural, e após o fechamento do tubo neural passa a ser expresso na região ventral inferior. Em cérebro adulto, a expressão de *PAX6* é mantida nas células progenitoras neurais das zonas subventricular e subgranular, e é a proteína chave para o desenvolvimento de neurônios glutamatérgicos no cerebelo (Yeung *et al.* 2016). Um modelo de estudo de lesão cerebral sugere que a expressão de *PAX6* estaria associada a geração de novos neurônios em áreas de dano, presentes em doenças neurodegenerativas (Thomas *et al.* 2016). Desta forma, a expressão aumentada de *PAX6* durante o período de maturação neural pode estar diretamente relacionada ao fenótipo clínico de neurodegeneração encontrado nas pacientes com IHPRF3.

O gene *Tbr1*, um fator de transcrição T-box (TF) neurônio-específico, desempenha um papel crítico na regulação da diferenciação de neurônios de projeção da camada mais profunda do neocórtex em desenvolvimento (Dwyer and O'Leary 2001; Mihalas and Hevner 2017). Além disso, *Tbr1* foi recentemente relacionado a deficiência intelectual, autismo e atraso no desenvolvimento, por regular a expressão de genes que são críticos para o desenvolvimento cortical (Notwell *et al.* 2016; Mihalas and Hevner 2017; Vegas *et al.* 2018; den Hoed *et al.* 2018; Kwan 2013). No desenvolvimento do córtex, *Tbr1* atua tanto como ativador (caso dos genes *RELN* e *BCL11B*) e repressor (em *Fezf2*), e a expressão alterada de genes regulados por *Tbr1* refletem a importância de seus níveis de atividade nas camadas corticais (Mihalas and Hevner 2017). O gene *RELN*, é responsável por controlar a migração neural nas camadas do cortex e manutenção de transmissão sináptica (Sánchez-Sánchez *et al.* 2018). O gene *BCL11B* está relacionado aos processos de apoptose, proliferação e diferenciação celular (Lessel *et al.* 2018). Já o gene *Fezf2* é um fator de

transcrição e marcador de neurônios da camada V do córtex, e atua na manutenção neural entre axônios (Clare *et al.* 2017). Ou seja, de uma maneira geral todos os genes estão relacionados a manutenção do córtex, um processo já bem relatado na literatura como uma das principais etiologias do TEA, além disso os três genes testados já foram associados a autismo e deficiência intelectual (Clare *et al.* 2017; Lessel *et al.* 2018; Sánchez-Sánchez *et al.* 2018). Apesar de *Tbr1* atuar como repressor de *Fezf2*, estudos demonstram que a expressão alterada (em tempo ou local errado) de *Tbr1* leva a ausência de expressão de *Fezf2* (Han *et al.* 2011). Sendo assim, a diminuição da expressão destes genes nos neurônios das pacientes com IHPRF3, poderia explicar pelo menos parcialmente o quadro de autismo e deficiência intelectual descritos na síndrome. O mecanismo pelo qual *TBCK* estaria envolvido neste processo ainda não é resolutivo, no entanto, de acordo com as hipóteses recentes de que tal gene atua no transporte de vesículas, leva-nos a pensar que *TBCK* é crucial para o processo de ativação e transporte destes fatores de transcrição essenciais para o desenvolvimento neural.

Conclusão

Em resumo a perda de função de *TBCK* no neurodesenvolvimento induz a um comprometimento da morfologia neuronal, e estaria envolvido no processo de maturação dos neurônios. O acúmulo de proteínas pré-sinápticas no soma neural de células de pacientes seria um indicativo de *déficit* nas vias de degradação proteica, já relacionadas aos mecanismos patogênicos de mutações em *TBCK*. Além disso, os neurônios de pacientes possuem alteração por completo da cascata de ativação da neurogênese glutamatérgica e a expressão de outros três genes relacionados ao desenvolvimento cortical e que já foram associados ao autismo e deficiência intelectual, e estariam provavelmente influenciando na modulação do fenótipo clínico de IHPRF3. Ademais, nós observamos que mesmo não apresentando uma característica clínica semelhante ao de pacientes com mutações bialélicas, as células neurais da progenitora (heterozigota) apresentaram um fenótipo semelhante ao de pacientes em alguns aspectos, e a partir deste dado seria possível delimitar o nível de alteração necessário para que a funcionalidade neuronal seja alterada e relacionada a patologia da doença. Para compreender a função molecular de *TBCK* em neurônios será necessário que mais experimentos sejam realizados. Com este trabalho, espera-se auxiliar na elucidação da fisiopatologia das mutações em *TBCK* no neurodesenvolvimento.

Bibliografia

Alazami, A.M., Patel, N., Shamseldin, H.E., et al. 2015. Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell reports* 10(2), pp. 148–161.

Anon Okita_et_al-2013-STEM_CELLS.pdf.

Beck-Wödl, S., Harzer, K., Sturm, M., et al. 2018. Homozygous TBC1 domain-containing kinase (TBCK) mutation causes a novel lysosomal storage disease - a new type of neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN15)? *Acta neuropathologica communications* 6(1), p. 145.

Bhoj, E.J., Li, D., Harr, M., et al. 2016. Mutations in TBCK, Encoding TBC1-Domain-Containing Kinase, Lead to a Recognizable Syndrome of Intellectual Disability and Hypotonia. *American Journal of Human Genetics* 98(4), pp. 782–788.

Boecker, C.A. and Holzbaur, E.L. 2019. Vesicular degradation pathways in neurons: at the crossroads of autophagy and endo-lysosomal degradation. *Current Opinion in Neurobiology* 57, pp. 94–101.

Chong, J.X., Caputo, V., Phelps, I.G., et al. 2016. Recessive Inactivating Mutations in TBCK, Encoding a Rab GTPase-Activating Protein, Cause Severe Infantile Syndromic Encephalopathy. *American Journal of Human Genetics* 98(4), pp. 772–781.

Clare, A.J., Wicky, H.E., Empson, R.M. and Hughes, S.M. 2017. RNA-Sequencing Analysis Reveals a Regulatory Role for Transcription Factor Fezf2 in the Mature Motor Cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10, p. 283.

Dwyer, N.D. and O'Leary, D.D. 2001. Tbr1 conducts the orchestration of early cortical development. *Neuron* 29(2), pp. 309–311.

Elsen, G.E., Bedogni, F., Hodge, R.D., et al. 2018. The epigenetic factor landscape of developing neocortex is regulated by transcription factors pax6→ tbr2→ tbr1. *Frontiers in Neuroscience* 12, p. 571.

Guerreiro, R.J., Brown, R., Dian, D., de Goede, C., Bras, J. and Mole, S.E. 2016. Mutation of TBCK causes a rare recessive developmental disorder. *Neurology. Genetics* 2(3), p. e76.

Han, W., Kwan, K.Y., Shim, S., et al. 2011. TBR1 directly represses Fezf2 to control the laminar origin and development of the corticospinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(7), pp. 3041–3046.

Handel, A.E., Chintawar, S., Lalic, T., et al. 2016. Assessing similarity to primary tissue and cortical layer identity in induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons through single-cell transcriptomics. *Human Molecular Genetics* 25(5), pp. 989–1000.

Den Hoed, J., Sollis, E., Venselaar, H., Estruch, S.B., Deriziotis, P. and Fisher, S.E. 2018. Functional characterization of TBR1 variants in neurodevelopmental disorder. *Scientific reports* 8(1), p. 14279.

Hothorn, T., Hornik, K. and Zeileis, A. 2006. Unbiased Recursive Partitioning: A Conditional Inference Framework. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 15(3), pp. 651–674.

Kwan, K.Y. 2013. Transcriptional dysregulation of neocortical circuit assembly in ASD. *International Review of Neurobiology* 113, pp. 167–205.

Langemeyer, L., Fröhlich, F. and Ungermann, C. 2018. Rab gtpase function in endosome and lysosome biogenesis. *Trends in Cell Biology* 28(11), pp. 957–970.

Lessel, D., Gehbauer, C., Bramswig, N.C., et al. 2018. BCL11B mutations in patients affected by a neurodevelopmental disorder with reduced type 2 innate lymphoid cells. *Brain: A Journal of Neurology* 141(8), pp. 2299–2311.

Liu, Y., Yan, X. and Zhou, T. 2013. TBCK influences cell proliferation, cell size and mTOR signaling pathway. *Plos One* 8(8), p. e71349.

Mandel, H., Khayat, M., Chervinsky, E., Elpeleg, O. and Shalev, S. 2017. TBCK-related intellectual disability syndrome: Case study of two patients. *American Journal of Medical Genetics. Part A* 173(2), pp. 491–494.

Melková, K., Zapletal, V., Jansen, S., et al. 2018. Functionally specific binding regions of microtubule-associated protein 2c exhibit distinct conformations and dynamics. *The Journal of Biological Chemistry* 293(34), pp. 13297–13309.

Menzies, F.M., Fleming, A. and Rubinsztein, D.C. 2015. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews. Neuroscience* 16(6), pp. 345–357.

Mihalas, A.B. and Hevner, R.F. 2017. Control of Neuronal Development by T-Box Genes in the Brain. *Current Topics in Developmental Biology* 122, pp. 279–312.

Moreira, D. P. 2016. Múltiplas abordagens para determinar os fatores genéticos que contribuem para o ASD. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/T.41.2017.tde-18102017-151418. Recuperado em 2019-09-05, de www.teses.usp.br

Nadadhur, A.G., Leferink, P.S., Holmes, D., et al. 2018. Patterning factors during neural progenitor induction determine regional identity and differentiation potential in vitro. *Stem Cell Research* 32, pp. 25–34.

Notwell, J.H., Heavner, W.E., Darbandi, S.F., et al. 2016. TBR1 regulates autism risk genes in the developing neocortex. *Genome Research* 26(8), pp. 1013–1022.

Okita, K. et al. 2013. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. Stem Cells 31, 458–466.

Ortiz-González, X.R., Tintos-Hernández, J.A., Keller, K., et al. 2018. Homozygous boricua TBCK mutation causes neurodegeneration and aberrant autophagy. *Annals of Neurology* 83(1), pp. 153–165.

Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M. and Lambright, D.G. 2006. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* 442(7100), pp. 303–306.

Parra-Damas, A. and Saura, C.A. 2019. Synapse-to-Nucleus Signaling in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders. *Biological Psychiatry*.

Prè, D., Nestor, M.W., Sproul, A.A., et al. 2014. A time course analysis of the electrophysiological properties of neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Plos One* 9(7), p. e103418.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., et al. 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 17(5), pp. 405–424.

Sánchez-Sánchez, S.M., Magdalon, J., Griesi-Oliveira, K., et al. 2018. Rare RELN variants affect Reelin-DAB1 signal transduction in autism spectrum disorder. *Human Mutation* 39(10), pp. 1372–1383.

Schafer, S.T., Paquola, A.C.M., Stern, S., et al. 2019. Pathological priming causes developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons. *Nature Neuroscience* 22(2), pp. 243–255.

Shi, Y., Kirwan, P. and Livesey, F.J. 2012. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nature Protocols* 7(10), pp. 1836–1846.

Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H.P.C. and Livesey, F.J. 2012. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nature Neuroscience* 15(3), pp. 477–86, S1.

Sumathipala, D., Strømme, P., Gilissen, C., Corominas, J., Frengen, E. and Misceo, D. 2019. TBCK Encephaloneuropathy With Abnormal Lysosomal Storage: Use of a Structural Variant Bioinformatics Pipeline on Whole-Genome Sequencing Data Unravels a 20-Year-Old Clinical Mystery. *Pediatric Neurology*.

Thomas, M.G., Welch, C., Stone, L., Allan, P., Barker, R.A. and White, R.B. 2016. PAX6 expression may be protective against dopaminergic cell loss in Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 15(1), pp. 73–79.

Torsten.HothornR-project.org, T. partykit : A Modular Toolkit for Recursive Partytioning in R.

Vegas, N., Cavallin, M., Kleefstra, T., et al. 2018. Mutations in TBR1 gene leads to cortical malformations and intellectual disability. *European Journal of Medical Genetics* 61(12), pp. 759–764.

Yeung, J., Ha, T.J., Swanson, D.J. and Goldowitz, D. 2016. A novel and multivalent role of pax6 in cerebellar development. *The Journal of Neuroscience* 36(35), pp. 9057–9069.

Zapata-Aldana, E., Kim, D.D., Remtulla, S., Prasad, C., Nguyen, C.-T. and Campbell, C. 2019. Further delineation of TBCK - Infantile hypotonia with psychomotor retardation and characteristic facies type 3. *European Journal of Medical Genetics* 62(4), pp. 273–277.

Material Suplementar

Tabela 1. Resumo das amostras utilizadas no presente estudo para cada experimento

				Experimentos				
Individuo	**Amostra**	**Origem**	**Células obtidas**	**qPCR**	**Western Blotting**	**IF**	**Análise dinâmica de neuritos**	**Eletrofisiologia**
Paciente	6331-1 cl.1	PBMC	iPSC, NSC, Neurônio imaturo e maduro	x	x	x	x	x
Paciente	6331-4 cl.1	PBMC	iPSC, NSC, Neurônio imaturo e maduro	x	x	x	x	x
Progenitora	6331-2 cl.2	PBMC	iPSC, NSC, Neurônio imaturo e maduro	x	x	x	x	x
Controle	7007-1 cl.1	PBMC	iPSC, NSC, Neurônio imaturo e maduro	x	x	x	x	x
Controle	8799-1 cl.1	PBMC	iPSC, NSC, Neurônio imaturo e maduro	x		x		x

Tabela S2. Primers utilizados no presente estudo. Todos os primers foram desenhados utilizando-se o programa PrimerBlast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)

Região	Forward	Reverse
OCT4	TCCCATGCATTCAAACTGAGG	CCAAAAACCCTGGCACAAACT
PAX6	TGTCCAACGGATGTGTGAG	TTTCCCAAGCAAAGATGGAC
SOX1	TGACACCAGACTTGGGTTTTAG	CAAAAGTGGGCTTCGCCTCT
CUX1	ACGGACCTTGAAAGGGCAAA	CCGATGAGAGCTGTTCCCTTAA
MAP2	ATGCGCTGATTCTTCAGCTTG	GTGTCGTGTTCTCAAAGGGTTG
Tbr1	AATTTCACCGGCACCAAACG	TGGGATCCGCCAAAATCACA
Tbr2	GAATCTCTAAAGCTAAGGTCCAGC	TGCCTGTTGATGTATGTCCTG
RELN	GGTCGTCCTCACTCGCAAAC	TCGCCTAAGTGACCTTCGTC
FEZF2	ATCCCCATAAGGAGCGCTTG	TTAAACACCTTGCCGCACAC
BCL11B	GAATAGATGCCGGGGCAATG	GCCACTTGGCTCCTCTATCTC
TBCK	GGTCATTGTCATCGTGGGGCAT	GGCAGTCACACTCTTGGTTCTTCA

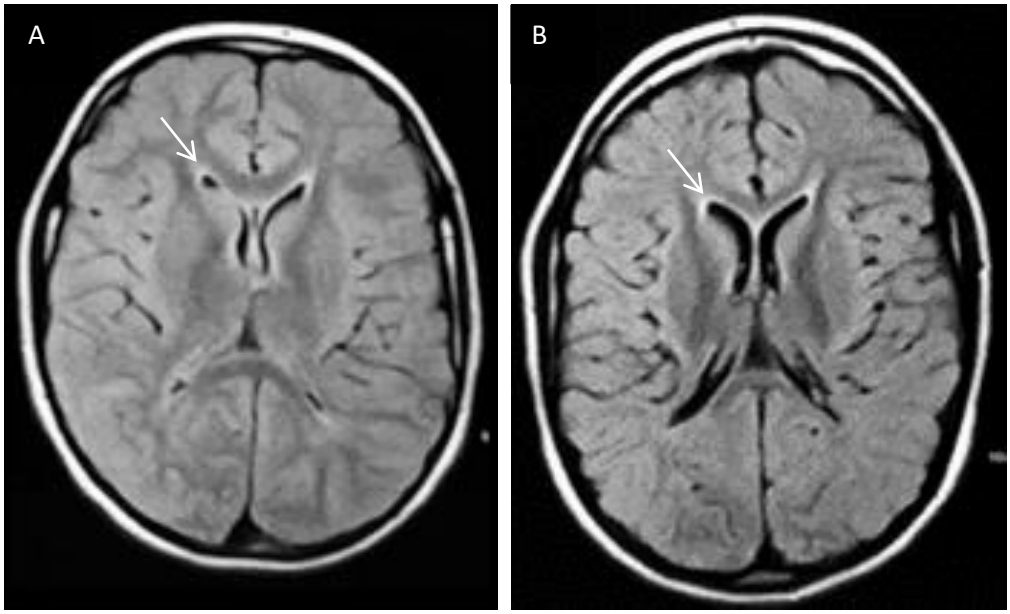


Figura S1. Características observadas em neuroimagens (RMM) pacientes com IHPRF3. Paciente 6331-1 (A) e Paciente 6331-4 (B) apresentam redução volumétrica e hiperintensidade de substância branca anormal em T2/FLAIR

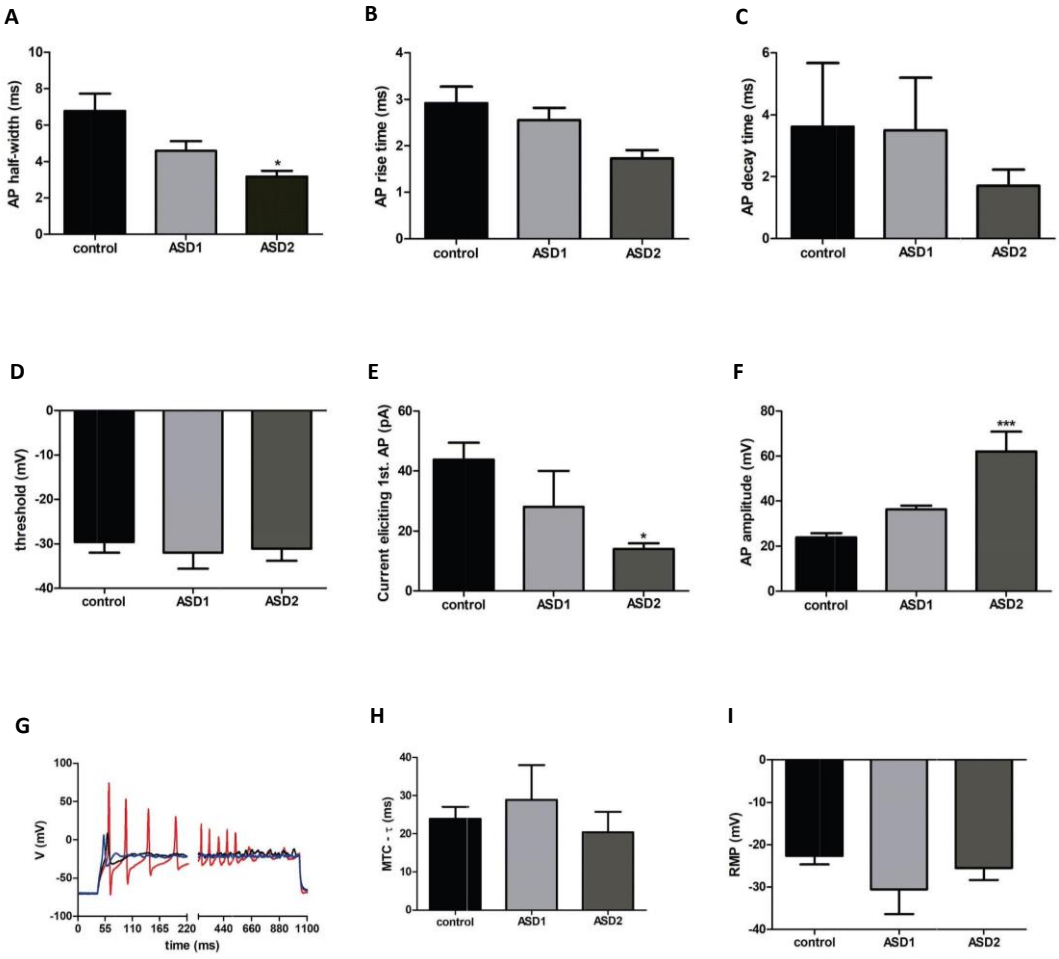


Figura 1. Análise das propriedades fisiológicas individualizadas para pacientes e controles. ASD1 = 6331-4 e ASD2 = 6331-1; (A) Altura e largura do potencial de ação de neurônios de pacientes e controles; (B) Tempo de decaimento do

potencial de ação entre os neurônios; (C) Tempo para que os neurônios disparassem o AP; (D) Limiar de AP de neurônios de pacientes e controles; (E) Número de correntes necessárias para que os neurônios disparassem potencial de ação; (F) Amplitude do potencial de ação (AP) entre neurônios de pacientes e controles; (G) APs representativos em resposta a injeções de corrente em neurônios de pacientes (6331-1 – vermelho; 6331-4 – azul) e controles (preto) com 60 dias de diferenciação; (H) Constante de membrana de neurônios de pacientes e controles; (I) Potencial médio da membrana em repouso.

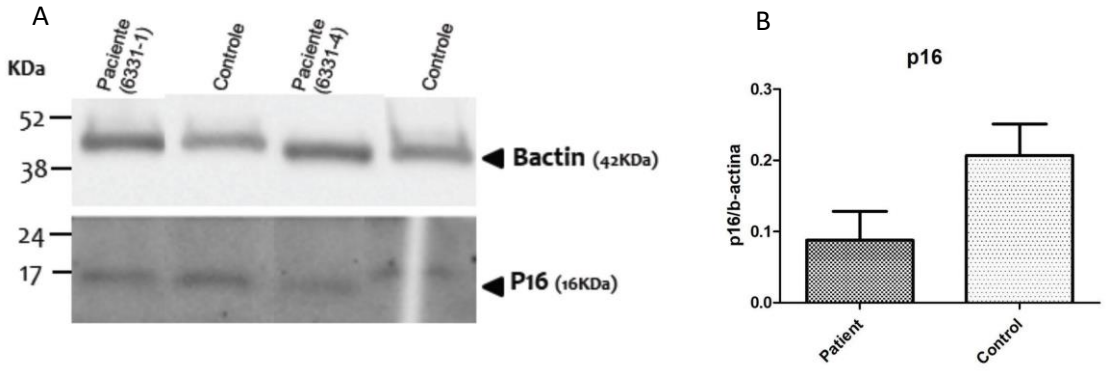


Figura S3. Mutações patogênicas em *TBCK* não alteram os níveis de senescência neuronal. (A) Quantificação proteica (Western Blot) de TBCK em neurônios maduros. (B) Gráfico da quantificação proteica de TBCK normalizados pelo nível de b-actina.

CAPÍTULO 4

Discussão geral e principais conclusões

Os estudos recentes demonstram que o TEA está presente em cerca de 1-2,4% da população mundial. Tal frequência representa uma parcela significativa da população e, portanto, envolve uma série de implicações para o sistema de educação e saúde pública no país. Atualmente, sabe-se que os fatores genéticos têm uma grande relevância na etiologia do TEA, contudo, os mecanismos moleculares ainda não estão elucidados para grande maioria dos casos. Neste sentido, os avanços na compreensão da genética do TEA podem levar a elucidação de mecanismos comuns entre diferentes tipos do autismo, e como consequência pode proporcionar o desenvolvimento de possíveis fármacos que atuem sob os principais sintomas desta condição. A sobreposição clínica entre síndromes com causas genéticas conhecidas e o autismo possuem implicações na nossa compreensão tanto a nível comportamental, assim como no nível molecular e biológico.

O avanço do sequenciamento de nova geração possibilitou a identificação de um grande número de genes candidatos ao TEA. Destaca-se, portanto, a importância em caracterizar os fenótipos clínicos ocasionados por estes novos genes de risco. Neste sentido, a primeira abordagem deste trabalho envolveu a caracterização fenotípica de uma coorte de indivíduos brasileiros com a síndrome de Phelan-McDermid (PMS), que é uma síndrome relativamente nova. A PMS está entre as síndromes mais frequentes entre os pacientes com TEA, e apesar dos esforços para caracterização genótipo-fenótipo recentes, a frequência e a base molecular de várias comorbidades presentes nessa síndrome, incluindo o autismo, permanecem divergentes e ainda não estão completamente elucidadas. Sendo assim, com aumento do número de pacientes descritos na literatura, tanto na caracterização clínica quanto a correlação genótipo-fenótipo, a fim de determinar a variabilidade clínica observada em pacientes com PMS, tornarão o prognóstico desta condição ainda mais preciso. Desta maneira, em nossa coorte composta por 34 pacientes, descrevemos os principais achados clínicos e genéticos (como a frequência de TEA em 80% dos pacientes), e exploramos a correlação genótipo-fenótipo da síndrome, delimitando as características clínicas em que é possível predizer a gravidade do quadro clínico de acordo com tamanho

da deleção. Além disso, descrevemos um paciente com deleção de 110kb que envolve o gene *SHANK3* com o diagnóstico de PMS, no entanto se destaca no restante da literatura por não apresentar atraso de neurodesenvolvimento, apresentando certa resiliência a este tipo de mutação. Tal quadro expande o espectro clínico de PMS e proporciona novas perspectivas para identificação de mecanismos protetivos que possam minimizar a gravidade desta condição.

Paralelamente às abordagens genéticas, a avaliação funcional de variantes associadas ao autismo *in vitro* é crucial para auxiliar na compreensão da fisiopatologia dos TEA. Tal estratégia se aplica principalmente aos genes recentemente associados ao autismo, como no caso do gene *TBCK*. Mutações patogênicas em *TBCK* foram primeiramente identificadas pelo nosso grupo e reportadas na literatura por outros estudos. Visto que este gene ainda não é bem caracterizado na literatura e os estudos de sua função molecular foram realizados somente em células não neurais, nós decidimos dedicar nossos esforços na investigação do papel de *TBCK* em células neuronais, que recapitulam fases importantes do neurodesenvolvimento. Através da técnica de reprogramação celular pudemos analisar as consequências de mutações bi-alélicas em *TBCK* em células neurais (NSCs, neurônios imaturos e maduros), diferenciadas a partir de iPSC que, portanto, representa o modelo mais fiel disponível para avaliar os efeitos funcionais de tais mutações no neurodesenvolvimento. Os resultados desta análise sugerem que *TBCK* estaria envolvido no processo manutenção neural, e tais alterações devem explicar pelo menos parte do fenótipo neurológico e de atraso de neurodesenvolvimento observado nas pacientes. Ademais, o processo de neurodegeneração associada à deficiência de *TBCK* evidencia sua relevância na manutenção neuronal, e sugere que variações dos níveis de *TBC*K, mesmo induzidos por mecanismos não genéticos ou como consequência de outros eventos mutacionais, podem contribuir para neurodegeneração.

Os genes candidatos ao TEA podem apresentar vias congruentes, como a desregulação da expressão de genes relacionados à manutenção sináptica e ao desenvolvimento cortical. As diferenças sutis entre os perfis clínicos de pacientes com TEA a fim de compreender como estes genes atuam no comportamento, são reveladas a partir de uma análise clinica detalhada, as quais talvez não fossem observadas em um diagnóstico mais amplo. A caracterização do autismo em síndromes monogênicas pode ser crucial para o desenvolvimento de intervenções apropriadas e individualizadas. Além disso, a pesquisa

continuada em síndromes monogênicas também é importante para melhor compreensão da etiologia ou dos mecanismos moleculares subjacentes à patologia destas condições e das estruturas envolvidas no TEA idiopático, que podem auxiliar no delineamento de novas estratégias terapêuticas.

Desta forma, com relação às abordagens adotadas no presente estudo concluímos que:

1) A correlação genótipo-fenótipo descrita no presente estudo assemelha-se a de outras populações;
2) Existe correlação entre o desenvolvimento das características clínicas como problema renal, linfedema e ausência da fala associados ao tamanho da deleção em 22q13.3;
3) A frequência de TEA na coorte brasileira de PMS foi de aproximadamente 74%, de acordo com outros estudos;
4) A frequência de alterações em *SHANK3* em uma coorte brasileira de TEA e em outra coorte de DI é 0.6% e semelhante com os dados da literatura;
5) É possível que alguns indivíduos apresentem certa resiliência a mutações em *SHANK3*, como o paciente com PMS que não apresenta deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento descrito pela primeira vez neste estudo;
6) Neurônios de pacientes com IHPRF3 apresentam alteração no tamanho do soma neural;
7) Mutações patogênicas em *TBCK* comprometem o processo de diferenciação dos neurônios corticais;
8) *TBCK* interfere na expressão dos principais genes relacionados ao desenvolvimento cortical e ao TEA/DI.

Anexo 1 – Protocolo de diferenciação direta a partir de iPSC para neurônios corticais e redes neurais

Meio de manutenção neural – Total 100mL

Meio N2 (50ml)		
N2 (Estoque a 0,5X)	1X	1mL
DMEM/F-12 + GlutaMax		47mL
Insulin Human Solution	5ug/mL	23,8uL
L-Glutamine ou GlutaMax	1mM	0,5mL
Non-essential aminoacids	100um	0,5mL
B-Mercaptoethanol	100uM	90uL
PenStrep	1%	0,5mL
Meio B-27 (50ml)		
B-27 (Estoque a 0,5X)	1X	2ml
Neurobasal Medium		47mL
L-Glutamine ou GlutaMax	200mM	0,5mL
PenStrep	1%	0,5mL

Obs: Antes de iniciar o processo de indução neural, é preciso que as células iPSC estejam com 80-100% de confluência.

Pré-indução: Lavar uma vez com PBS 1X antes de adicionar meio

Meio de manutenção neural + 1uM Dorsomorfina + 10uM SB431542 = **Meio de indução neural**

- Adicionar 3,5ml/placa do meio de indução neural. As células deverão ser mantidas na estufa e meio deve ser trocado todo dia. (observar a formação de uma camada de células neuroepiteliais ao longo dos dias 8-12) – ideal 10d.

Obs: iPSC apresentam nucléolos grandes e durante a diferenciação as células se tornarão mais compactas com núcleos menores.

Indução Neural – Passagem 1: é necessário ter a camada neuroepitelial bem formada e uniforme

Opção 1: utilizando dispase (com a dispase os clumps parecem ser mais homogêneos)

- Antes de iniciar o processo de passagem é necessário incubar a Dispase (diluição de acordo com instruções do fabricante) em 37°C para ativá-la

- Trocar o meio da placa (adicionar meio de manutenção neuronal) e distribuir 100ul de dispase por mL de meio de maneira homogênea. Incubar a placa por 3min a 37°C.

- Retirar todo o meio + dispase, e adicionar novo meio. Com o scraper, raspe a placa gentilmente para soltar as células em clumps. Se necessário faça *up and downs* bem devagar 3x).

- Centrifugue as células a 160g por 2min na temperatura ambiente e descarte o sobrenadante. Gentilmente ressuspenda as células em meio de indução neural (com fatores) a 37°C e plaqueie em placas pré tratadas com poliornitina e laminina.

- Adicione Y-27632 (10mM) no meio e mantenha overnight. Troque o meio no dia seguinte para o meio de manutenção neural (sem fatores de indução).

Opção 2: Utilizando somente PBS1X

- Riscar a placa com uma ponteira 200 em pedaços grandes (com o meio)

- Sugar o meio e incubar a placa com 1,5ml de PBS1X por 5min RT.

- Com o auxílio de um Cell Lifter, raspe a placa sempre na mesma direção. Verificar se os "clumps" estão com tamanhos parecidos (cerca de 300 a 500 células). Se não, se deve fazer up-downs lentamente a fim de quebrar a camada.

- Recolher o pellet de células + PBS1X. (Lavar a placa com PBS para retirar as células que possam ter sobrado)

- Centrifugar por 2 min a 0.5rpm

- Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 1 ml de meio Meio de indução neural + 1uM Dorsomorfina + 10uM SB431542.

- Prepara duas placas de 60 com poli-ornitina e laminina, e adicionar 2,5 ml de meio de indução neural + 1uM Dorsomorfina + 10uM SB431542.

- Incubar overnight e trocar o meio para o de manutenção neural (sem dorso e SB) no dia seguinte.

Surgimento das rosetas

Obs: As rosetas deverão aparecer entre os dias 12-17 após a indução neural no meio de manutenção neural. A partir deste ponto, o meio deverá ser trocado dia sim e dia não.

- Após o aparecimento das rosetas, deve-se adicionar 20ng/mL de FGF (meio de manutenção neural + FGF) por aproximadamente 2-4 dias, afim de promover a expansão celular. Com a placa confluente, deve-se realizar uma nova passagem.

Obs: Não pode deixar com FGF por muito tempo pois as células perdem a identidade cortical!

Expansão de NSC e diferenciação neuronal – Passagem 2:

OBS: Se a passagem 1 ocorrer bem, deve-se repetir o mesmo procedimento (Opção com dispase ou PBS1x).

- Riscar a placa com uma ponteira 200 em pedaços grandes (com o meio)

- Sugar o meio e incubar a placa com 1,5ml de PBS1X por 5min RT.

- Centrifugar as células por 5min a 0,2 rpm

- Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 1 ml de meio de manutenção neural.

- Ressuspender as células no meio de manutenção neural e plaquear em placas de poli-ornitina e laminina (passar para 2 ou 3 placas de 60mm dependendo da quantidade de células). O meio deve ser trocado no dia seguinte.

- Manter por 4-6 dias. Se as células expandirem novamente, deve-se repetir a passagem mais uma vez.

Diferenciação neuronal – Passagem 3:

Obs: Entre os dias 20-30 após a indução neural, uma neurogênese deve ocorrer. Os neurônios deverão se acumular do lado externo das rosetas. Neste ponto as células deverão ser passadas novamente utilizando-se Accutase.

- Lavar a placa 1X com PBS e adicionar 0,5 ml de Accutase em cada placa de 35mm

- Incubar por 5min a 37°

- Com a P1000 fazer cerca de 3-4 up-downs afim de dissociar as células em single-cell.

- Adicionar 2ml em um tubo falcon + as células para diluir a Accutase e centrifugar por 5min em 0,2rpm.

- Descartar o sobrenadante e ressuspender as células no meio de manutenção neural.

- Plaquear em placas de poli-ornitina e laminina de 35mm com 50000 células por cm^2. Trocar o meio no dia seguinte.

PAUSA: Nesta etapa as NSC podem ser congeladas

- Entre os dias 27-31 após a indução, deve-se passar as células utilizando-se a Accutase (1 placa de 35mm, para 4 de 35mm) novamente assim como descrito anteriormente.

Obs: Pode-se adicionar laminina (100ug/mL) a cada 10 dias para que os neurônios não soltem da placa.

- Os neurônios deverão ser mantidos em cultura até 50-60 dias após a última passagem. (Verificar melhor momento para caracterização: Primários- 20d; Maduros – 70d).

Idade neuronal: deve ser contado a partir da indução neural