UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Gabriela Koch Alvarenga

Estudos de correlação genótipo-fenótipo em pacientes com a síndrome de Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características 3 (IHPRF3)

Genotype-phenotype correlation studies in patients with Hypotonia Infantile with Psychomotor Retardation and Characteristic Facies 3 (IHPRF3) syndrome

São Paulo

2021

Gabriela Koch Alvarenga

Estudos de correlação genótipo-fenótipo em pacientes com a síndrome de Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características 3 (IHPRF3)

Genotype-phenotype correlation studies in patients with Hypotonia Infantile with Psychomotor Retardation and Characteristic Facies 3 (IHPRF3) syndrome

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em ciências na área de concentração Aconselhamento Genético e Genômica Humana

Orientadora: Prof.a Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno

EXEMPLAR CORRIGIDO – O original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP.

São Paulo

2021

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências

Koch Alvarenga, Gabriela

Estudos de correlação genótipo-fenótipo em pacientes com a síndrome de Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características 3 (IHPRF3) / Gabriela Koch Alvarenga; orientadora Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno. -- São Paulo, 2021.

69 p.

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

Versão original

1. IHPRF3. 2. TBCK. 3. Correlação Genótipo-Fenótipo. I. dos Santos e Passos-Bueno, Maria Rita dos Santos. II. Título

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Folha de Avaliação

Nome: Alvarenga, Gabriela Koch

Título: Estudos de correlação genótipo-fenótipo em pacientes com a síndrome de Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características 3 (IHPRF3)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em ciências na área de concentração Aconselhamento Genético e Genômica Humana

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Mário R. Passos Bueno

Agradecimentos

À professora Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno pela orientação e discussões que possibilitaram que eu realizasse este trabalho

A todos os profissionais que acompanhei nos ambulatórios do CEGH-CEL por colocarem o aconselhamento genético em evidência em nosso país

Ao Dr. Thomas Rafael Gollop pela experiência enriquecedora que foi acompanhá-lo durante as diversas sessões de aconselhamento genético, pelas discussões e ensinamentos, e por ser minha inspiração e referência como profissional ético e de excelência na área

Aos meus pais e minha irmã, por serem minha base, referência e maiores incentivadores da minha educação

Ao meu namorado, Rafael, pelo apoio constante durante as idas e vindas semanais entre Porto Alegre e São Paulo para a realização do mestrado

Lista de Figuras

Figura 1 - Heredograma, imagens e identificação da mutação em <i>TBCK</i> nos irmãos descritos por Guerreiro <i>et al.</i> (P3,P4 e P5).....	4
Figura 2 - Heredogramas e imagens de 5 indivíduos com IHPRF3 descritos por Chong <i>et al.</i> (P6 - P10).....	6
Figura 3 - Características faciais de indivíduos com IHPRF3 descritos por Bhoj <i>et al.</i> (P19, P11, P13, P14, P16, e P17).....	7
Figura 4 - Características clínicas em indivíduos com a mesma mutação em <i>TBCK</i> (NM_001163435.2:c.376C>T:p.Arg126*).....	9
Figura 5 - Características clínicas das pacientes descritas por Beck-Wodl <i>et al.</i> (P35 e P36).....	10
Figura 6 - Características clínicas das pacientes descritas por Zapata-Aldana <i>et al.</i> (P33 e P34).....	11
Figura 7 - Esquema Comparativo de Homólogos de <i>TBCK</i>	13
Figura 8 - <i>Immunoblotting</i> de <i>TBCK</i> em diferentes frações celular de quatro linhagens celulares.....	14
Figura 9 - Localização celular de <i>TBCK</i>	15
Figura 10 - Representação esquemática das isoformas de <i>TBCK</i> e domínios correspondentes.....	16
Figura 11 - Depleção de <i>TBCK</i> inibe a proliferação celular.....	17
Figura 12 - O silenciamento de <i>TBCK</i> reduz o tamanho celular.....	18
Figura 13 - <i>TBCK</i> participa da organização da actina.....	19
Figura 14 - Processo de autofagia.....	21
Figura 15 - Fibroblastos <i>TBCK</i> -/- apresentam aumento significativo em autofagossomos LC3+.....	23
Figura 16 - Fibroblastos de pacientes com mutações p.R126X apresentam perfis de oligossacarídeos alterados.....	24
Figura 17 - Gráfico de etnias de pacientes com IHPRF3.....	29
Figura 18 - Localização das variantes genéticas em <i>TBCK</i>	39

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Variantes patogênicas em pacientes com IHPRF3.....	31
Tabela 2 - Características fenotípicas presentes nos diferentes relatos de IHPRF3.....	35
Tabela 3 - Distribuição das variantes de TBCK na casuística (heterozigotos compostos - em laranja).....	41
Tabela 4 - Localização das variantes genéticas dos pacientes heterozigotos compostos com IHPRF3.....	43
Tabela 5 - Agrupamento dos pacientes com IHPRF3 de acordo com a localização das variantes em TBCK.....	43
Tabela 6 - Agrupamento dos pacientes com IHPRF3 em Grupo Quinase e Grupo Não Quinase.....	44
Tabela 7 - Análise estatística das características fenotípicas no grupo quinase e no grupo não quinase.....	46

Siglas e Abreviações

BIPAP - *Bilevel Positive Pressure Airway*

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

DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DI - Deficiência Intelectual

EJC – *Exon-exon junction*

GAG - Glicosaminoglicanos

GFP - *Green Fluorescent Protein*

G-Tube - Sonda de gastrostomia

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

IHPRF – *Infantile Hypotonia with Psicomotor Retardation and Characteristic Facies*

IHPRF1 – *Infantile Hypotonia with Psicomotor Retardation and Characteristic Facies*
1

IHPRF2 – *Infantile Hypotonia with Psicomotor Retardation and Characteristic Facies*
2

IHPRF3 – *Infantile Hypotonia with Psicomotor Retardation and Characteristic Facies*
3

LC3 - *Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos*

mRNA – RNA mensageiro

mTOR – *Mammalian Target Of Rapamycin*

mTORC - Complexo de mTOR

mTORC1 - Complexo 1 de mTOR

mTORC2 – Complexo 2 de mTOR

NALCN - *Sodium Leak Channel; Nonselective*

NMD - Nonsense-mediated mRNA decay

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*

pb - *Pares de bases*

PTC – *Premature Stop Codons*

RabGAP - *Rab GTPase-activating protein*

RM - Ressonância magnética

RHOD - *Rhodanese*

RNAi - Interferência de RNA

SPSS - *Statistical Package for Social Sciences*

TBC - Tre-2, Bub2 e Cdc16

TBCKE - Encéfaloneuropatia associada a TBCK

TBCK – *TBC1 Domain Containing Kinase*

TBCK-DD - Desordem de Deficiência de TBCK

UNC80 - *UNC80 Homolog, NALCN Channel Complex Subunit; UNC8*

USP - Universidade de São Paulo

UTR - *Untranslated Region*

Resumo:

Mutações de perda de função em homozigose ou em heterozigose composta distribuídas em diferentes regiões do gene *TBCK* (*TBC1 Domain Containing Kinase*) resultam em uma doença do neurodesenvolvimento de herança autossômica recessiva denominada como Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características 3 (IHPRF3; OMIM 616900). Esta síndrome apresenta início dos sintomas ao nascimento ou no início da infância; a deficiência no desenvolvimento global, deficiência intelectual, hipotonia e algumas características dismórficas são os sintomas mais prevalentes. Apesar disso, os pacientes com IHPRF3 apresentam fenótipo bastante variável, não apresentando um *gestalt* consistente e característico da síndrome. Atualmente, se desconhece a correlação entre o genótipo e fenótipo na IHPRF3, cujo conhecimento pode contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares associados à doença bem como para melhor compreender o prognóstico da síndrome. Portanto, o presente estudo revisou a literatura referente a 37 casos de IHPRF3 reportados previamente, somados a 2 casos de pacientes brasileiras avaliados pelo Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células Tronco (CEGH-CEL). O conjunto fenotípico de 42 características presentes na casuística foi correlacionado com as diferentes alterações genotípicas localizados em duas regiões distintas de *TBCK* (domínio Quinase e Não Quinase). Observou-se a existência de uma correlação entre pacientes com mutações localizadas no domínio Quinase do gene *TBCK* e as características hipotonia grave ($p=0,012$) e macroglossia ($p=0,000$). Além disto, observamos que algumas comorbidades estão sendo avaliadas na síndrome (ex: hipertrigliceridemia, osteoporose, hipotireoidismo, bexiga neurogênica, autismo, puberdade precoce e insuficiência adrenal) de maneira heterogênea, e dados relativos destas alterações clínicas ou laboratoriais só são referidos em alguns estudos. Assim sendo, é de grande valia o estabelecimento de um questionário padronizado para a avaliação da síndrome IHPRF3, de forma a proporcionar melhor caracterização clínica da doença e sua progressão. Estes conhecimentos são importantes para beneficiar os pacientes e suas famílias quanto ao melhor delineamento do prognóstico desta síndrome.

Palavras-chaves: IHPFR3, *TBCK*, Correlação Genótipo-Fenótipo

Abstract:

Homozygous or compound heterozygous loss of function mutations, spread across different regions of the TBCK gene (TBC1 domain Containing Kinase) result in an inherited autosomal recessive neurodevelopmental disorder, known as Hypotonia Infantile with Psychomotor Retardation and Characteristic Facies 3 (IHPRF3; OMIM 616900). This syndrome has an onset of symptoms at birth or in early infancy; global developmental delay, intellectual disability, hypotonia and dysmorphic features are prevalent phenotypic features of the syndrome. Despite this, a clearly identifiable gestalt associated with this syndrome has not yet been identified, as multiple IHPRF3 patients showed a diverse phenotypic spectrum. To this day, the IHPRF3 genotype-phenotype correlation remains unknown, and its knowledge could contribute to elucidate molecular mechanisms associated with the syndrome, as well as to better comprehend the syndrome prognosis. Therefore, the present study reviewed the literature referred to 37 previously reported cases of IHPRF3, in addition to 2 cases of Brazilian patients assessed by *Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células Tronco* (CEGH-CEL). The phenotypic set of 42 comorbidities present in the sample of this study was correlated with distinct mutations located across two main regions of the TBCK gene (Kinase and Non-Kinase domain). Throughout the statistical analysis of the genotype and phenotype data, severe hypotonia ($p=0,012$) and macroglossia ($p=0,000$) were more prevalent in IHPRF3 patients with mutations located within the Kinase domain. Furthermore, the phenotypical analysis led to the conclusion that some comorbidities are not being assessed a heterogeneous way in this syndrome (e.g.: hypertriglyceridemia, osteoporosis, hypothyroidism, neurogenic bladder, autism, precocious puberty and adrenal insufficiency) and the data of these clinical or laboratory alterations is only referred to in some studies. Hence, it would be of great value to establish a standard questionnaire for the evaluation of IHPRF3 syndrome, in order to provide a better clinical characterization of the disease and its progression. This information is key to help patients and their families have a more detailed prognosis of this syndrome.

Keywords: IHPFR3, TBCK, Genotype-Phenotype Correlation

SUMÁRIO

1.Introdução:	1
1.1. Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características 3	3
1.2. TBCK: Gene e proteína	13
1.2.1 Localização celular da proteína TBCK e diferentes isoformas	14
1.2.2 Função de TBCK	16
1.2.2.1 mTOR e TBCK	20
1.2.3 Autofagia e TBCK	21
2. Objetivos	25
3. Casuística e métodos:	26
3.1 Casuística	26
3.2 Métodos	26
3.2.1 Categorização das variantes em domínios e regiões de TBCK	26
3.2.2 Levantamento dos dados fenotípicos	27
3.2.3 Levantamento dos dados genotípicos	27
3.2.4 Análise Estatística	28
4. Resultados:	29
4.1 Dados Clínicos	29
4.2 Análise Fenotípica	35
4.3 Análise Genotípica	39
4.4 Associação Genótipo-Fenótipo	42
5. Discussão	47
6. Conclusões:	53
7. Referências bibliográficas	55

1. Introdução

A perda de função bialélica de *TBC1 Domain Containing Kinase* (*TBCK*; OMIM 616899) (4q24) resulta em uma doença do neurodesenvolvimento de herança autossômica recessiva denominada como Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características 3 (IHPRF3; OMIM 616900) que também pode ser identificada com outras denominações, como: Síndrome de Deficiência Intelectual Associada ao *TBCK* (BHOJ *et al.*, 2016; CHONG *et al.*, 2016; MANDEL *et al.*, 2017), Encéfaloneuropatia associada a *TBCK* (TBCKE) (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018), Desordem de Deficiência de *TBCK* (TBCK-DD) (BECK-WÖDL *et al.*, 2018). Desde o primeiro relato de IHPRF3, mais de 35 pacientes foram descritos na literatura com diversas mutações em homozigose ou heterozigose composta distribuídas em diferentes regiões ao longo do gene *TBCK* (ALAZAMI *et al.*, 2015; BECK-WÖDL *et al.*, 2018; BHOJ *et al.*, 2016; CHONG *et al.*, 2016; GUERREIRO *et al.*, 2016; MANDEL *et al.*, 2017; MOREIRA, 2017; ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018; SUMATHIPALA *et al.*, 2019; ZAPATA-ALDANA *et al.*, 2019).

Existem mais dois tipos de Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características (IHPRF) com mesmo padrão de herança autossômico recessivo que a IHPRF3; A IHPRF1 (OMIM 615419) é causada por mutações no gene *UNC80* (OMIM 612636) e a IHPRF2 (OMIM 616801) é causada por mutações no gene *NALCN* (OMIM 611549). Apesar da heterogeneidade genética presente nos três tipos de IHPRF, as três doenças apresentam fenótipo semelhante (AL-SAYED *et al.*, 2013; BHOJ *et al.*, 2016; SHAMSELDIN *et al.*, 2016).

A grande maioria dos indivíduos afetados por IHPRF3 apresenta atraso no desenvolvimento global, hipotonia grave, fácies distintas, insuficiência respiratória crônica, desenvolvimento psicomotor precário ou inexistente, limitação grave na fala, incapacidade de caminhar independentemente e epilepsia (BHOJ *et al.*, 2016; GUERREIRO *et al.*, 2016; ZAPATA-ALDANA *et al.*, 2019). No entanto, apesar da predominância de certas características fenotípicas nestes indivíduos, a casuística de pacientes com IHPRF3 apresenta um vasto e diverso espectro de características físicas e neurológicas com graus de gravidade distintos (ALAZAMI *et al.*, 2015; BECK-WÖDL *et al.*, 2018; BHOJ *et al.*, 2016; CHONG *et al.*, 2016; GUERREIRO *et al.*, 2016;

MANDEL *et al.*, 2017; MOREIRA, 2017; ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018; SUMATHIPALA *et al.*, 2019; ZAPATA-ALDANA *et al.*, 2019).

Alguns pacientes com IHPRF3 apresentam um perfil não progressivo com deficiência intelectual (DI) moderada, características autistas e capacidade motora limitada (BHOJ *et al.*, 2016), enquanto outros apresentam DI profunda, leucoencefalopatia progressiva, atrofia cerebral acompanhada de fraqueza neuromuscular extrema, epilepsia refratária controlada por medicamentos, e insuficiência respiratória crônica. Desse modo, embora a síndrome seja denominada “Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características 3” ainda parece não existir um *gestalt* consistente e característico resultante da deficiência de TBCK (MANDEL *et al.*, 2017).

Os mecanismos moleculares que levam a ampla variabilidade de comorbidades apresentadas pelos indivíduos acometidos por IHPRF3 ainda são desconhecidos. As mutações são na sua grande maioria de perda de função em decorrência de mutações que levam a criação de um códon de parada prematuro (PTC) e estão localizadas em diferentes domínios funcionais do gene. A expectativa é que estas variantes levem a um decaimento do RNA mensageiro (mRNA) em função da criação dos PTCs. O decaimento de mRNA mediado por mutações *nonsense* (NMD) funciona como um sistema de controle de qualidade de transcritos mutados ou *spliced* incorretamente, dessa forma o NMD degrada mRNAs com PTCs, assim prevenindo a produção de proteínas truncadas que podem resultar em doenças nos humanos (KERVESTIN; JACOBSON, 2012). Todavia, este sistema não distingue PTCs presentes no penúltimo exon localizado no complexo de junção exon-exon (EJC) (KHAJAVI; INOUE; LUPSKI, 2006; LE HIR *et al.*, 2000); logo, mRNAs com códons *nonsense* nessas posições podem vir a escapar do mecanismo NMD. Neste caso, os fenótipos resultantes de mutações de perda de função localizadas no final do gene podem ser diferentes daqueles resultantes de mutações localizadas nas regiões proximais e intermediárias do gene. Porém, ainda que em teoria, todas as mutações *nonsense* e *frameshift* que resultam em PTCs naturalmente sejam alvos da ação do NMD, não é determinado que NMD é a única via responsável por modular a gravidade das doenças através da alteração da estabilidade do mRNA (BEN-SHACHAR *et al.*, 2009). Logo, com o intuito de testarmos se existe diferença entre a expressividade fenotípica e a localização das variantes nos pacientes, propusemos um estudo de correlação entre genótipos e fenótipos nos indivíduos com mutações de perda de função em

TBCK. A seguir uma revisão da literatura relacionada ao tema de interesse desta dissertação.

1.1. Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características 3 (IHPRF3)

A IHPRF3 foi descrita clinicamente pela primeira vez no ano de 2008 por Smith *et al.*, que relatou o caso de três irmãos (P3, P4 e P5; Figura 1 e Tabela 1), dois meninos e uma menina, de origem europeia com um fenótipo distinto que compreendia hipotonia grave, deficiência grave do desenvolvimento global, epilepsia e estrabismo (SMITH *et al.*, 2008). Inicialmente, o caso ficou sem diagnóstico conclusivo, até que no ano de 2016 com o avanço das tecnologias genéticas, Guerreiro *et al.* identificaram a mutação causadora da síndrome apresentada pelo trio: uma deleção de quatro pares de base (NM_001163435.2:c.803_806del:p.Met268Argfs*26) em homozigose no gene TBCK, enquanto os pais, assintomáticos e sem histórico de consanguinidade, apresentavam a deleção apenas em heterozigose no gene TBCK (Figura 1) (GUERREIRO *et al.*, 2016).

Outras características dismórficas apresentadas pelo trio, foram olhos proeminentes, braquioplagiocefalia e dedos do pé sobrepostos. Além disto, o paciente P4 apresentou *sinus* pré auricular, a paciente P5 mamilos invertidos, e ambos começaram a desenvolver sinais de puberdade precoce, respectivamente aos sete anos e cinco anos de idade (GUERREIRO *et al.*, 2016). Dois dos três irmãos vieram a óbito precocemente: O irmão mais velho apresentava crises epilépticas difíceis de serem controladas, falecendo inesperadamente aos nove anos de idade (SMITH *et al.*, 2008); já a irmã mais nova, foi internada aos doze anos de idade devido uma grave infecção pulmonar, sofrendo uma parada cardíaca e vindo a óbito (GUERREIRO *et al.*, 2016).

Figura 1: Heredograma, imagens e identificação da mutação em *TBCK* nos irmãos descritos por Guerreiro *et al.* (P3,P4 e P5).

(A) Heredograma mostrando a segregação completa da mutação c.803_806del; p.Met268Argfs*26 em *TBCK* nos membros da família analisados. (B) Imagens dos irmãos afetados com IHPRF3. (C) Resultado do sequenciamento de Sanger dos membros da família analisados (dois irmãos afetados, os pais, e um irmão não afetado). Os três primeiros cromatogramas representam a sequência referência e os membros da família com deleção de 4pb em heterozigose. Os dois últimos cromatogramas representam dois dos irmãos afetados com a mesma deleção, porém em homozigose. Adaptada de (GUERREIRO *et al.*, 2016).

Somente no ano de 2016 com a descoberta do diagnóstico molecular da síndrome, se chegou a um consenso sobre sua nomenclatura, atribuindo-se o nome Hipotonia Infantil com Retardo Psicomotor e Fácies Características 3 para indivíduos com deficiência de *TBCK* (BHOJ *et al.*, 2016; GUERREIRO *et al.*, 2016). No ano anterior à determinação do termo IHPRF3 para a síndrome, pesquisadores sequenciaram o exoma de 143 famílias consanguíneas da Arábia Saudita com intuito de obter genes candidatos para doenças neurogenéticas. Neste estudo foram identificados dois irmãos (P1 e P2; Tabela 1) que apresentavam características similares às descritas por Smith *et al.*, possuindo uma variante de sítio de *splice* em homozigose no gene *TBCK* (NM_001163435.2:c.1897+1G>A) (ALAZAMI *et al.*, 2015).

Ainda em 2016, Chong *et al.* reportaram mais 5 crianças (P6 - P10; Tabela 1) entre 2 e 14 anos de idade, apresentando sinais clássicos de IHPRF3 como:

Deficiência no desenvolvimento global, hipotonia grave resultando em insuficiência respiratória e sonda de gastrostomia (G-Tube) (Figura 2). Os cinco pacientes são provenientes de quatro famílias distintas, sendo duas primas (P7 e P8) oriundas de família consanguínea libanesa, um paciente (P9) de família consanguínea egípcia com histórico de irmã similarmente afetada, porém falecida; e dois pacientes (P6 e P10) não aparentados e descendentes de porto-riquenhos. Características faciais dismórficas presentes nos pacientes incluem: Estreitamento bitemporal (5/5), ponte nasal alta (5/5), arco do cupido proeminente (5/5), sobrancelhas arqueadas (4/5), narinas antevertidas (4/5), olhos profundos (3/5), traços faciais grosseiros (3/5), macroglossia (2/5) e hiperplasia gengival (2/3). Outras características reportadas nestes indivíduos foram: Reflexos reduzidos ou ausentes (4/5), crises epiléticas (4/5), osteoporose (4/4), deficiência visual e outros problemas na visão como esotropia e catarata (5/5). Exames de ressonância magnética destes indivíduos apresentaram ventriculomegalia e atrofia cerebral, volume reduzido de substância cinzenta e branca, afinamento do corpo caloso, redução volumétrica dos núcleos da base, hipoplasia cerebelar e anomalias periventricular de substância branca. Quatro destes indivíduos: P6 e P10 (NM_001163435.2:c.376C>T:p.Arg126*); e P7 e P8 (NM_001163435.2:c.1363A>T:p.Lys455*) apresentaram mutações *nonsense*. No entanto, apenas um indivíduo (P9) nessa coorte possui mutação *missense* (NM_001163435.2:c.1532G>A:p.Arg511His), a qual prevê a alteração de um resíduo de arginina altamente conservado no domínio TBC de *TBCK* (CHONG *et al.*, 2016).

Figura 2: Heredogramas e imagens de 5 Indivíduos com IHPRF3 descritos por Chong *et al.* (P6 - P10). (A–D) Heredogramas das famílias A–D, onde as mutações de perda de função no gene TBCK segregam com a doença. Quadrados pretos indicam indivíduos afetados por IHPRF3. (E–J) Imagens que mostram a similaridade das características faciais e hipotonia nos indivíduos: P6 (A-II-1) aos 25 meses (E) e 13 anos (F), indivíduo P7 (B-IV-4) aos 17 meses (G) e 4 anos, 3 meses (H), indivíduo P8 (B-IV-6) aos 18 meses (I), indivíduos P9 (C-II-1) aos 21 meses (J), e indivíduo P10 (D-II-1) aos 14 anos. Adaptada de (CHONG *et al.*, 2016).

No mesmo ano da publicação de Chong *et al.*, Bhoj *et al.* identificou outros onze indivíduos (P11 - P21; Tabela 1) de oito famílias distintas afetados por IHPRF3 todos apresentando deficiência intelectual e hipotonia, além de outras características com expressão variável, como: traços faciais grosseiros e macroglossia (Figura 3), características que se assemelhavam a distormismos faciais vistos em doenças de depósito, e apesar de não serem características universais, podem vir a se manifestar conforme o desenvolvimento destes pacientes (BHOJ *et al.*, 2016).

Figura 3: Características faciais de indivíduos com IHPRF3 descritos por Bhoj *et al.* (P19, P11, P13, P14, P16 e P17).

Indivíduos P19 (A) e P11 (D) apresentam traços faciais grosseiros com macroglossia evidente, e as irmãs P13 (B) e P14 (E) sem distormismos significantes. O indivíduo P16 (C) apresenta características dismórficas moderadas, incluindo testa larga, nariz bulboso e boca aberta com macroglossia, lábios carnudos, palato profundo e mandíbula prognata; Já o paciente P17 (F) possui pescoço curto e testa larga. Adaptada de (BHOJ *et al.*, 2016).

O indivíduo menos afetado (P12) dos onze pacientes, possui a única variante *missense* e apresentou atraso moderado do desenvolvimento e poucas anomalias na ressonância magnética (RM). Essa variante *missense* envolve um nucleotídeo altamente conservado, codificando um aminoácido também altamente conservado até a *C.elegans* (considerando 13 espécies), com uma diferença físico-química moderada entre Leucina e Prolina (Distância Grantham = 98 [0–215]), encontrada no domínio TBC, e é prevista ser deletéria por SIFT (*score*= 0.01, mediana= 3.35) e causadora de doença pelo *MutationTaster* (valor *p*= 1). Portanto, existe a possibilidade de que variantes patogênicas *missense* não estejam sendo diagnosticadas corretamente devido a expressão mais branda do fenótipo tornando a variante menos facilmente reconhecida como causadora de doença. Em contrapartida, variantes que supostamente levam a perda de função da proteína devido a substituições em sítios de *splice*, pequenas inserções ou deleções, e deleções multiexônicas aparentemente resultou em pacientes com fenótipos mais graves (BHOJ *et al.*, 2016).

Mandel *et al.* descreveu a evolução fenotípica de duas irmãs árabes (P22 e P23; Tabela 1) fruto de uma relação consanguínea, portadoras de uma mutação em homozigose (NM_001163435.2:c.1854delT:p.Pro618Glnfs*42) que altera o quadro de leitura de TBCK e que foi associada a presença de anomalia cerebral congênita. O curso do desenvolvimento pré-natal das pacientes se apresentou aparentemente normal e sem alterações cerebrais detectadas no ultrassom, o que provavelmente indica que vieram a se desenvolver logo após o nascimento. Um fator visto nas duas gestações das probandas é o nível elevado de HCG no soro materno no segundo trimestre de ambas as gravidezes, porém se este é um fator contribuinte para o diagnóstico ou um achado incidental ainda não é possível afirmar, pois necessita de mais dados. O prognóstico de IHPRF3 aparenta se agravar de acordo com o desenvolvimento dos indivíduos, tendo estas pacientes manifestado ao final da infância sintomas como deficiência intelectual, mudez, hipotonia e crises epiléticas (MANDEL *et al.*, 2017).

No ano de 2018, Ortiz-González *et al.* reportou sete novos pacientes do sexo masculino, de idades variando dos 9 aos 14 anos, com origem porto-riquenha, sem histórico de consanguinidade e com a mesma mutação fundadora em homozigose (NM_001163435.2:c.376C>T:p.Arg126*) no gene TBCK, resultando em um fenótipo que inclui deficiência intelectual, hipotonia congênita, epilepsia, neuropatia motora progressiva, leucoencefalopatia, arreflexia, traços faciais grosseiros, macroglossia, estreitamento bitemporal, dislipidemia e osteoporose (Figura 4). O exame de TSH foi realizado em seis pacientes e apenas três destes foram diagnosticados com hipotireoidismo. Além disto, todos os pacientes mostraram algum grau de regressão do desenvolvimento na adolescência, o que não havia sido reportado por estudos anteriores a este (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Figura 4: Características clínicas em Indivíduos com a mesma mutação em TBCK (NM_001163435.2:c.376C>T:p.Arg126*). Traços faciais grosseiros nos pacientes P28 (imagem a, aos 13 anos) e P29 (imagem b, aos 12 anos); dedos afilados (c) e atrofia muscular distal (e). Braquimelia das extremidades superiores e inferiores dos membros e acromelia das mão e pés (c,d). Adaptada de (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Beck- Wodl *et al.*, também no ano de 2018, reportaram o caso de duas irmãs europeias (P35 e P36; Tabela 1) (NM_001163435.2:c.304C>T:p.Gln102*), filhas de pais saudáveis com consanguinidade distante. A paciente P35 começou a apresentar hipotonia a partir dos quatro meses de idade, o que progressivamente resultou em uma deficiência do desenvolvimento motor e aos sete anos de idade o tamanho corporal da paciente se apresentava reduzido, o que também aconteceu com sua irmã, P36, aos onze anos. As pacientes P35 e P36 apresentavam deficiência intelectual e deficiência desenvolvimento da fala, P36 possui acuidade visual extremamente reduzida, enquanto P35 era deficiente visual, porém ambas com capacidade auditiva intacta, inclusive a paciente P36 desenvolveu hiperacusia. Além

disso, ambas pacientes apresentavam algumas características dismórficas como pescoço curto, boca em formato de tenda, boca aberta, macroglossia, língua fissurada e esotropia (Figura 5). As pacientes vieram a óbito devido a mesma causa, broncopneumonia com insuficiência respiratória, respectivamente aos 7 anos e 3 meses de idade (P35) e aos 11 anos de idade (P36) (BECK-WÖDL *et al.*, 2018).

Figura 5: Características clínicas das pacientes descritas por Beck-Wodl *et al.* (P35 e P36). P35 (A) aos 6 anos de idade e P36 (B) aos 3 anos de idade apresentando hipotonia leve, pescoço curto e dismorfismos faciais moderado como boca aberta, boca em formato de tenda, macroglossia, língua fissurada e esotropia direita Adaptada de (BECK-WÖDL *et al.*, 2018).

Em 2019, Zapata-Aldana *et al.* relataram o caso de duas irmãs sírias (P33 e P34; Tabela 1) sem histórico de consanguinidade e doenças genéticas na família e portadoras de uma nova mutação (NM_001163435.2:c.753dup:p.Lys252*) em homozigose no gene *TBCK*. As pacientes apresentavam algumas características comuns entre elas: braquioplagiocefalia, testa inclinada, olhos profundos, boca em formato de tenda, estreitamento bitemporal, filtro labial longo e boca aberta (Figura 6). Além dos dismorfismos, o exame neurológico em ambas probandas identificou atraso no desenvolvimento motor, no desenvolvimento da linguagem, deficiência intelectual, hipotonia grave, hiperreflexia e falta de contato visual. Outras características como microcefalia, sinófris, macroglossia, língua fissurada, hirsutismo, crises epiléticas,

puberdade precoce e comportamento autodestrutivo foram reportadas somente e uma das duas pacientes (ZAPATA-ALDANA *et al.*, 2019).

Figura 6: Características clínicas das pacientes descritas por Zapata-Aldana *et al.* (P33 e P34). P33 (A e B) e P34 (C e D) apresentando olhos profundos, filtro labial longo, boca aberta, boca em formato de tenda, macroglossia, pescoço curto e hipotonia grave (B e D). Língua fissurada é uma característica presente somente na P35 (A), enquanto a P36 apresenta sinófris leve e esotropia esquerda (C). A tala no braço direito de P36 (D) é para prevenção de lesão devido ao comportamento auto-destrutivo da paciente. Adaptada de (ZAPATA-ALDANA *et al.*, 2019).

No mesmo ano, um grupo de pesquisadores nórdicos revisou um caso previamente estudado no ano de 1997, onde havia sido proposto que uma menina de 11 anos (P37; Tabela 1) possuía uma nova doença lisossômica e sofria de encefaloneuropatia progressiva, porém, na época, sem diagnóstico molecular (STRØMME *et al.*, 1997); posteriormente, foram identificadas nesta paciente duas deleções em homozigose no gene TBCK (NM_001163435.2:c.2060_2235del;p.Glu687Valfs*8) resultando na perda do quadro de leitura e gerando um códon de parada prematuro (SUMATHIPALA *et al.*, 2019).

A publicação mais recente envolvendo pacientes com IHPRF3 reportou o caso de duas irmãs marroquinas (P38 e P39; Tabela 1) portadoras de uma nova mutação (NM_001163435.2:c.535_545del;p.Leu179ArgfsTer10) em homozigose em TBCK. As pacientes apresentavam deficiência no desenvolvimento motor, no desenvolvimento cognitivo e da fala, epilepsia, hipotonia e as mesmas características dismórficas como macrocefalia, boca em formato de tenda, boca aberta, palato ogival e pescoço curto (SAREDI *et al.*, 2020).

Além dos indivíduos descritos na literatura, duas pacientes adicionais (P24 e P25; Tabela 1) foram diagnosticadas com IHPRF3 no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de

São Paulo (CEGH-CEL/ IB-USP), que representam as primeiras pacientes de nacionalidade brasileira caracterizadas com deficiência de TBCK até o presente momento. As pacientes foram diagnosticadas com autismo, deficiência intelectual, atraso do desenvolvimento global, dislipidemia e hipotireoidismo. Ambas as irmãs apresentavam as mesmas características dismórficas como olhos profundos, ponte nasal proeminente, arco do cupido proeminente, palato ogival, dentes espaçados, estreitamento bitemporal e persistência da almofada digital. Além desse conjunto de características em comum, apenas a paciente P25 apresentava braquidactilia e unhas hipoplásicas nos dedos do pé (MOREIRA, 2017).

Assim sendo, atualmente a casuística total de pacientes de IHPRF3 é de 39 indivíduos, 19 do sexo masculino e 20 do sexo feminino. Destes 39 indivíduos, 33 pacientes possuem alterações no gene TBCK em homozigose enquanto apenas 6 indivíduos são heterozigotos compostos (ALAZAMI *et al.*, 2015; BECK-WÖDL *et al.*, 2018; BHOJ *et al.*, 2016; CHONG *et al.*, 2016; GUERREIRO *et al.*, 2016; MANDEL *et al.*, 2017; MOREIRA, 2017; ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018; SUMATHIPALA *et al.*, 2019; ZAPATA-ALDANA *et al.*, 2019; SAREDI *et al.*, 2020).

Visto que atualmente não existem estudos sistemáticos de correlação genótipo e fenótipo em pacientes com IHPRF3, o presente estudo tem como objetivo testar esta relação, cujos resultados poderão contribuir para melhor definição do prognóstico aos pacientes acometidos por esta síndrome, cujo espectro fenotípico e genotípico é muito variável.

1.2 TBCK: Gene e proteína

O gene TBCK que está localizado no braço longo do cromossomo quatro (4q24), codifica uma proteína homônima, *TBC1- Domain Containing Kinase* (TBCK) com 893 aminoácidos, e possui massa molecular de 99 kDa. A proteína TBCK contém um domínio TBC (Tre-2, Bub2 e Cdc16) (1aa - 273aa) flanqueado por um domínio Quinase (466aa - 651aa) na região N-terminal (aparentemente inativo devido a falta de subdomínios catalíticos essenciais) e um domínio *Rhodanese* (RHOD) (790aa - 889aa) na região C-terminal. Além disto, foram descobertos supostos ortólogos de TBCK humano altamente conservados em outras espécies como *M.musculus*, *D.rerio*, *D.melanogaster* e *C.elegans* (Figura 7) (BOUDEAU *et al.*, 2006; LIU; YAN; ZHOU, 2013; SCHEEFF *et al.*, 2009).

Figura 7: Esquema Comparativo de Homólogos de TBCK.

Supostos ortólogos do TBCK humano: em *M.musculus*, *D.rerio*, *D.melanogaster* e *C.elegans*. Barras vermelhas, verdes e azuis indicam respectivamente possível domínio Quinase, domínio TBC e domínio RHOD. Adaptada de (LIU; YAN; ZHOU, 2013).

O mRNA de TBCK e sua proteína aparentam estar expressos na maioria dos órgãos humanos (<https://www.proteinatlas.org/>); além disto, dados de transcriptoma de cérebros de camundongos sugeriram a expressão de TBCK em astrócitos, neurônios e oligodendrócitos (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

1.2.1 Localização celular da proteína TBCK e diferentes isoformas

Em 2014, Wu *et al.* investigaram a expressão e a localização celular da proteína TBCK através das técnicas de *immunoblotting* e imunofluorescência. A expressão endógena de TBCK foi analisada utilizando anticorpos em frações citosólicas, nucleares e em lisados de células inteiras em quatro linhagens celulares distintas (A431, HeLa, HepG2 e HEK293FT). Detectou-se TBCK em lisados de células inteiras e no citoplasma de todas as linhagens celulares testadas, com peso molecular aproximado de 95kDa (Figura 8). Além disto, foram identificadas bandas adicionais de peso molecular similar nas linhagens HepG2 e HEK293FT, possivelmente resultantes de *splicing* alternativo ou modificações pós-traducionais (WU *et al.*, 2014).

Figura 8: *Immunoblotting* de TBCK em diferentes frações celulares de quatro linhagens celulares. O TBCK está localizado principalmente no citoplasma ou em lisados de células inteiras com massa molecular de 95kDa. Adaptada de (WU *et al.*, 2014).

De acordo com os achados do *immunoblotting*, os resultados da imunofluorescência indicaram que o TBCK está localizado principalmente no citoplasma durante a interfase em células HeLa (Figura 9A). Na metáfase, uma parte do acúmulo de TBCK foi encontrada no fuso mitótico, entretanto apesar deste acúmulo estar circundando o fuso mitótico (marcado por fluorescência da α -tubulina e a localização de GFP-TBCK (Figura 9B), ele não está colocalizado exatamente com as fibras dos microtúbulos. Ao final da mitose, na telófase, foi observado um corpúsculo central entre duas células filhas (Figura 9A).

Figura 9: Localização celular de TBCK.

A) Imunofluorescência de células HeLa transfectadas com TBCK marcados por GFP (verde) utilizando um anticorpo autoimune centríolo-específico (vermelho) sobreposto com coloração DAPI (azul). Escala: 10 µm. B) Localização sobreposta entre TBCK e α -tubulina em célula metafásica. Escala 5 µm. Adaptada de (WU *et al.*, 2014).

As isoformas de TBCK foram caracterizadas de acordo com a sequência de seu RNA mensageiro (mRNA), como isoformas longas e curtas, totalizando nove transcritos, seis do tipo longo e três do tipo curto. As isoformas longas contêm os domínios Quinase, TBC e RHOD, enquanto as isoformas curtas não possuem a região Quinase (Figura 10). Acredita-se que aos tipos de isoformas (longas e curtas) do TBCK são, provavelmente, resultantes de diferentes inícios da transcrição (WU *et al.*, 2014; WU; LU, 2021).

Figura 10: Representação esquemática das isoformas de TBCK e domínios correspondentes: O esquema acima das isoformas descreve os três domínios de TBCK juntamente com suas posições nos aminoácidos (aa) e exons, alinhados com a estrutura das isoformas. Abaixo, seis isoformas longas representadas pelas letras A-F e três isoformas curtas representada pela letra G-I. As 5' UTRs estão representadas como barras coloridas (verde, vermelha e laranja) indicando o início da transcrição, e 3'UTRs representadas em barras azuis. As linhas azuis representam os introns separando os exons conhecidos representados como retângulos amarelos e exons recentemente identificados representados por retângulos roxos. Adaptada de (WU; LU, 2021).

Visto que a única diferença entre os dois tipos de isoformas longa e curta de TBCK é a presença ou ausência do domínio Quinase, se supõe que a isoforma longa de TBCK inibe a proliferação celular através da suposta atividade da Quinase. Corroborando com a suposição anterior, também existe evidência que o *splicing* alternativo das isoformas longas de TBCK, no qual os exon 4-6 localizados no domínio Quinase são utilizados de maneira variável, e é possível que as isoformas possam ter atividades enzimáticas distintas (WU *et al.*, 2014).

1.2.2 Função de TBCK

A função de TBCK foi investigada por Liu *et al.* em 2013, através do silenciamento do TBCK endógeno de células HEK293 por RNAi, alvejando duas regiões distintas do mRNA de TBCK (TBCK-RNAi-1 e TBCK-RNAi-2). A análise de *Western Blot* mostrou uma redução nos níveis proteicos de TBCK quando as células foram infectadas com TBCK-RNAi-1 ou TBCK-RNAi-2 em comparação com os controles infectados por vírus (RNAi-con) (Figura 11A). O silenciamento de TBCK

inibiu efetivamente a proliferação celular HEK293 (Figura 11 B, C e D) e também reduziu significativamente o tamanho das células (Figura 12D), o que indica um possível envolvimento de TBCK em ambos os processos de proliferação e crescimento celular (LIU; YAN; ZHOU, 2013).

Figura 11: Depleção de TBCK inibe a proliferação celular. Células HEK293 infectadas com lentivírus, alvejando duas regiões do mRNA de TBCK (TBCK-RNAi-1 ou 2) foram submetidas a *Western Blot* (A), contagem celular (B), microscopia de fluorescência (C), e análises MTT (D). Bar, 200mm. Adaptada de (LIU; YAN; ZHOU, 2013).

Figura 12: O silenciamento de TBCK reduz o tamanho celular.

As células HEK293 foram infectadas com lentivirus e submetidas a microscopia (A–B) e citometria de fluxo (C–D). (A–B) Sinais GFP-positivos indicam as células infectadas por lentivirus. Bar, 20 μm . As medidas de áreas de células infectadas foram quantificadas através do software Image-Pro Plus 6.0. (C–D) Histograma representativo da citometria de fluxo mostra o tamanho da distribuição (FSC-H) das células GFP-positivas coradas com iodeto de propídio. Adaptada de (LIU; YAN; ZHOU, 2013).

Devido ao tamanho celular estar intimamente relacionado à organização do citoesqueleto, os pesquisadores examinaram o efeito de TBCK na regulação da actina e do microtúbulo em células HEK293. Concluiu-se que a depleção de TBCK induz uma redução significativa de F-actina rompendo as fibras *stress*, enquanto a actina cortical parece não ser afetada (Figura 13A e 13B). Porém, a depleção do TBCK não alterou de maneira considerável a estrutura do microtúbulo quando comparada com células controle (Figura 13C e 13D). Estes dados sugerem que o TBCK possui um papel na organização da actina, mas não do microtúbulo (LIU; YAN; ZHOU, 2013).

Figura 13: TBCK participa da organização da actina. As células HEK293 foram infectados com lentivirus e submetidos a imunofluorescência corado com *phalloidin-TRITC* (A) ou anticorpo *anti-α-tubulin* de fluxo (C). Células infectadas com lentivírus são GFP-positivos. DNA visualizado através do corante DAPI. Bar, 10mm. Imagem do sinal de *phalloidin-TRITC* (B) ou *α-tubulin* (D) em paletas *rainbow*. Adaptada de (LIU; YAN; ZHOU, 2013).

O TBCK tem sido proposto como uma suposta proteína ativadora para pequenas GTPases da família Rab (CHONG *et al.*, 2016). As Rabs possuem funções conservadas no transporte vesicular de membrana (BARR; LAMBRIGHT, 2010). Algumas proteínas do domínio TBC de TBCK foram caracterizadas com RabGAP (*Rab GTPase-activating protein*) que catalisam a hidrólise GTP das proteínas Rab. Além disso, o domínio TBC possui aminoácidos essenciais para a atividade de RabGAP em RabGAPs funcionais (PAN *et al.*, 2006).

A escassez de artigos investigando diretamente a função de *TBCK* refletem a demanda de mais trabalhos que determinem a função de *TBCK* em diferentes tipos celulares e de diferentes papéis em potencial para isoformas alternativas (WU *et al.*, 2014; GUERREIRO *et al.*, 2016).

1.2.2.1 mTOR e TBCK

Os processos de proliferação celular e de crescimento celular são distintos entre si, porém ambos os processos desempenham papéis essenciais no desenvolvimento de um órgão e de um organismo por completo. Estes processos precisam ser coordenados de modo preciso para que células, órgãos ou organismos atinjam seu tamanho ideal (SCHMELZLE; HALL, 2000); no entanto, o mecanismo subjacente é pouco compreendido. Pesquisas mostram que o alvo mamífero da rapamicina (mTOR) regula ambos os processos de crescimento celular e proliferação celular em várias espécies. Logo, acredita-se que é um componente essencial nestes processos biológicos (HAY; SONENBERG, 2004; KIM; GUAN, 2011; LOEWITH; HALL, 2011; SCHMELZLE; HALL, 2000).

mTOR interage com diversas proteínas para formar dois complexos distintos: o complexo 1 de mTOR (mTORC1) e o complexo 2 de mTOR (mTORC2) (LAPLANTE; SABATINI, 2012). O complexo mTORC1 é sensível a rapamicina e está envolvido nos processos de crescimento celular, proliferação celular, metabolismo e autofagia (LAPLANTE; SABATINI, 2012; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). Por outro lado, mTORC2 é resistente ao tratamento agudo com rapamicina e participa na organização do citoesqueleto de actina (DOS D. SARBASSOV *et al.*, 2004; JACINTO *et al.*, 2004). Apesar da sinalização de mTOR contribuir com muitos processos celulares, pouco se sabe sobre a regulação da expressão de mTOR.

Visto que a via de mTOR possui papel essencial na regulação da proliferação celular, crescimento celular e organização da actina (LAPLANTE; SABATINI, 2012), se supõe que TBCK poderia estar envolvido na regulação da via de mTOR. O silenciamento de TBCK resultou na redução do nível protéico e da fosforilação de mTOR, e também reduziu o nível protéico de componentes do complexo de mTOR (mTORC), sugerindo que TBCK pode modular a via sinalizadora de mTOR influenciando os componentes de sinalização de mTOR. Além disto, foi comprovado que a depleção de TBCK induz a uma redução significativa nos níveis proteicos e de mRNA dos componentes de mTORC, sugerindo um envolvimento de TBCK com a via sinalizadora de mTOR a nível transcricional (LIU; YAN; ZHOU, 2013).

1.2.3 Autofagia e TBCK

A autofagia é um sistema de degradação intracelular que em seu funcionamento normal realiza a digestão de conteúdos que não possuem mais utilidade como organelas danificadas ou velhas, proteínas desnecessárias e agentes patogênicos, assim os componentes macromoleculares resultantes dessa digestão são liberados de volta para o citosol (Figura 14) (BENBROOK; LONG, 2012). Este mecanismo funciona como um meio de controle homeostático celular, um sistema de gerenciamento de estresse, e é regulado de maneira distinta em condições celulares variáveis. Quando as células estão expostas a condições estressantes (ex: escassez de nutrientes, estresse oxidativo e radiação), o maquinário autofágico é ativado para que desintoxique rapidamente as células, aumentando a reciclagem de componentes celulares para manter as atividades celulares intensificadas (FOUILLET *et al.*, 2012; KURIHARA *et al.*, 2012; LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012; ONODERA; OHSUMI, 2005).

Figura 14: Processo de autofagia. Autofagia entrega material citoplasmático ao compartimento lisossomal para degradação. 1: Membranas doadoras nucleiam uma membrana isolante. 2: A membrana isolante expande e engloba material citoplasmático incluindo organelas e macromoléculas. 3: A membrana isolante matura em um autofagossomo fechado com dupla membrana. 4: A membrana autofagossomal externa se funde com o lisossomo, levando a degradação da membrana interna e de seu conteúdo interno. 5: Os componentes são reciclados de volta para o citoplasma. Adaptada de (ZAFFAGNINI; MARTENS, 2016).

O processo autofágico, tanto em condições patológicas como em condições fisiologicamente normais, participa da inibição da apoptose; na falta de uma regulação rigorosa deste processo, a autofagia excessiva pode funcionar como uma via apoptótica alternativa (DECUYPERE; PARYS; BULTYNCK, 2012; WANG *et*

al., 2012; MAIURI *et al.*, 2007). Devido a isto, o processo autofágico desregulado tem sido associado com o início e a progressão de várias doenças como câncer, transtornos autoimunes, neurodegenerativos e de armazenamento lisossomal (MENZIES; FLEMING; RUBINSZTEIN, 2015; JIANG; MIZUSHIMA, 2014).

O *TBCK* pode estar envolvido no processo autofágico através da regulação de duas vias distintas, como a via mTOR e pequenas GTPases da família Rab. A sinalização de um dos complexos de mTOR, o mTORC1 é conhecida por regular a autofagia (MENZIES; FLEMING; RUBINSZTEIN, 2015; TSUKADA; OHSUMI, 1993). A inibição de mTORC1 leva a um aumento na quantidade de autofagossomos nas células, corroborando com dados que sugerem que a perda de função de *TBCK* resulta na inibição da sinalização de mTORC1 (BHOJ *et al.*, 2016). Além disto, o *TBCK* tem sido proposto como uma suposta proteína ativadora para pequenas GTPases da família Rab (CHONG *et al.*, 2016), a qual regula a fusão dos autofagossomos com os lisossomos (GUTIERREZ, 2004; JAGER, 2004; KIRISAKO *et al.*, 1999; SZATMÁRI; SASS, 2014).

Visto que mutações de perda de função no gene *TBCK* estão associadas com a inibição da sinalização de mTORC1 e esta sinalização regula o processo de autofagia, Ortiz-González *et al.* hipotetizaram que os pacientes portadores de mutações de perda de função em *TBCK* apresentam defeitos na disfunção autofágica-lisossômica. Com intuito de comprovar a hipótese proposta, foi utilizada a técnica de imunocoloração com o marcador de autofagia celular LC3, que é comumente utilizado para detectar autofagossomos; a técnica foi aplicada em fibroblastos controles e em fibroblastos derivados de pacientes com deficiência de *TBCK* (NM_001163435.2:c.376C>T:p.Arg126*). Detectou-se um aumento significativo de pontilhados marcados com LC3b por célula (Figura 15), um resultado sugestivo de acúmulo de autofagossomos em fibroblastos *TBCK*-/. Através de Imunocoloração e *Western blot* com marcadores autofágicos, foi quantificado o conteúdo de autofagossomos em fibroblastos de pacientes com deficiência de *TBCK* e os fibroblastos exibiram níveis aumentados de autofagossomos LC3+ e aumento do fluxo autofágico, assim confirmando o acúmulo de autofagossomos nas células destes pacientes (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Figura 15: Fibroblastos TBCK ^{-/-} apresentam aumento significativo em autofagossomos LC3+. Imunocoloração LC3b (vermelha) de pacientes com IHPRF3 (b) comparada com controles (a). Núcleo corado com DAPI (azul). Paineil C apresenta quantificação automatizada pontilhada utilizando o software Zeiss Zen azul (n=51 selvagens e n=106 células TBCK de 2 experimentos independentes); Teste de Mann Whitney valor de p.0044. Dados de TBCK p.Arg126* reunidos de 3 linhas de pacientes distintos. Adaptada de (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Visto que a via autofágica-lisossômica é crucial para a degradação de proteínas glicosiladas, foram analisados os perfis de oligossacarídeos para examinar os produtos da degradação. Estudos anteriores mostraram que células com problemas na iniciação da autofagia ou com disfunção lisossomal acumulam espécies de oligossacarídeos. Logo, fibroblastos provenientes de pacientes com mutações (NM_001163435.2:c.376C>T:p.Arg126*) em homozigose no TBCK foram testados e apresentaram perfis de oligossacarídeos alterados indicando acúmulo de oligossacarídeos (Figura 16 c).

Figura 16: Fibroblastos de pacientes com mutações p.Arg126* apresentam perfis de oligossacarídeos alterados.

Perfis de espectrometria de massa MALDI-TOF de fibroblastos controles (a). Espécies de oligossacarídeos com alto peso molecular (a esquerda do perfil) acumulam devido a deficiência da degradação autofágica-lisossômica em células controles tratadas com a rapamicina, que é inibidora de mTORC1 (b) e em células TBCK -/- R126x (c). Defeitos na degradação em células TBCK -/- Arg126* podem ser melhoradas com administração de leucina (d), que ativa a sinalização de mTORC1. Adaptada de (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Além disto, constatou-se que o tratamento com leucina (ativador de mTORC1) em fibroblastos TBCK -/- resgata parcialmente o perfil de oligossacarídeos alterado (Figura 16 d). Também foram analisadas amostras de urina de pacientes com IHPRF3, pois os oligossacarídeos livres também podem ser detectados na urina. Dessa maneira, foram testados 5 pacientes com as mesmas mutações p.Arg126* e 3 pacientes com outros genótipos; 2 pacientes heterozigotos compostos (c.[2060-2A>G];[803_806del]:p.[=];[Met268Argfs*26]); 1 paciente com deleção homozigota do exon 21. A análise da urina resultou em um padrão similar de oligossacarídeos alterados como os vistos nos fibroblastos analisados anteriormente. Apenas um paciente realizou a análise de glicosaminoglicanos urinários (GAG) que obteve resultado significativamente alterado apresentando aumento total de GAG, bem como um padrão fracionado alterado, reforçando ideia de uma redução na capacidade de degradação lisossomal nos pacientes acometidos por IHPRF3 (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

2.Objetivos

O aconselhamento genético para pacientes com IHPRF3 é dificultado devido a variabilidade fenotípica e os poucos relatos na literatura de portadores dessa síndrome. Dessa maneira, a compreensão sobre a associação entre os genótipos distintos e o fenótipo extremamente variável desses pacientes é necessária para fornecer um prognóstico mais específico aos afetados por IHPRF3 e assim um aconselhamento genético mais completo para o paciente e suas famílias. Logo, o objetivo deste trabalho é:

- Verificar se há correlação entre genótipos e fenótipos nos pacientes com variantes bi-alélicas patogênicas em *TBCK*

Para cumprirmos este objetivo, adotamos as seguintes estratégias:

- a) Revisão da literatura quanto aos dados clínicos dos pacientes com IHPRF3 comprovados molecularmente;
- b) Análise das variantes de acordo com a região da proteína e sua correlação com os dados clínicos;
- c) Avaliação dos resultados obtidos e suas implicações no prognóstico de pacientes com IHPRF3

3. Casuística e métodos

3.1. Casuística

Os pacientes estudados nesse trabalho são provenientes de estudos publicados na literatura, totalizando 37 pacientes, bem como duas pacientes adicionais que foram avaliadas pelo ambulatório de autismo do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL / IB-USP) e têm sido acompanhadas pela equipe multidisciplinar no CEGH-CEL / IB-USP. O serviço de aconselhamento genético do CEGH-CEL conta com uma equipe multidisciplinar que avaliou o caso das pacientes de forma minuciosa contando com um histórico clínico detalhado. A casuística total, portanto, possui um total de 39 indivíduos de diferentes idades (2 - 18 anos) provenientes de 26 famílias, sendo 19 do sexo masculino e 20 do sexo feminino.

3.2. Métodos

3.2.1 Categorização das variantes em domínios e regiões de TBCK

Indivíduos com alterações em heterozigose composta foram incluídos na categorização das variantes somente quando ambas as variantes estivessem localizadas na mesma região. Portanto, aqueles com variantes em heterozigose composta em regiões distintas de *TBCK*, foram excluídos da pesquisa. Dessa maneira, os pacientes foram primariamente divididos em quatro grupos distintos baseado na localização da alteração genética de cada indivíduo, sendo elas no:

- 1- Domínio Quinase
- 2- Entre o domínio Quinase e o domínio TBC (Entre Quinase e TBC);
- 3- Domínio TBC ou;
- 4- Entre o domínio TBC e RHOD (Entre TBC e RHOD)

O agrupamento foi revisto, a depender do número de pacientes por classes, de forma a termos um número semelhante entre os grupos.

3.2.2 Levantamento dos dados fenotípicos

Os dados fenotípicos dos pacientes com IHPRF3 foram coletados por meio de uma análise minuciosa da literatura. As variantes clínicas reportadas compõem uma lista extensa, e observamos que estão presentes em diferentes frequências nos pacientes com IHPRF3 e nem todas os sinais clínicos são avaliados de forma sistemática entre os estudos. Diante disso, foram selecionadas apenas uma parcela dessas comorbidades para que a análise estatística fosse viável. Desse modo, variantes clínicas não foram incluídas na pesquisa de acordo com os seguintes critérios:

- 1- Características frequentes em 90% ou mais dos pacientes da casuística e;
- 2- Características muito pouco caracterizadas (descritas em apenas 1 ou 2 pacientes da casuística).

3.2.3 Levantamento dos dados genotípicos

Os dados genotípicos foram obtidos através das publicações na literatura tanto na sequência referência do transcrito NM_033115, como na versão mais atual NM_001163435.2. No entanto, todos dados genotípicos mencionados nesta pesquisa se referem de maneira uniforme a versão NM_001163435.2. As alterações genéticas identificadas neste estudo foram classificadas em quatro grupos:

- 1- *Nonsense* (mutação sem sentido)
- 2- *Missense* (mutação de sentido trocado)
- 3- *Frameshift* (mutação com quadro de leitura alterado)
- 4- Sítio de *Splice*

3.2.4 Análise estatística

Com intuito de caracterizar e comparar os dados clínicos dos pacientes estudados, realizou-se uma análise descritiva das características prevalentes na casuística. O Teste Qui-Quadrado de Pearson foi selecionado para realizar a análise estatística e investigar a relação entre variantes categóricas e os grupos de pacientes determinados na pesquisa. Utilizou-se o software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Dados clínicos

O estudo compreende um total de 39 pacientes (Tabela 1) provenientes de 26 famílias, de 12 diferentes etnias (Figura 17) e com idades que variam dos 2 aos 18 anos no último exame. Em relação às etnias dos pacientes, mais da metade são porto-riquenhos (30,77%) e europeus (20,51%). As mutações estão presentes em homozigose em 33 pacientes (85%) e em heterozigose composta em apenas 6 pacientes (15%), e distribuídas em diferentes regiões e domínio de TBCK. Além disto, a casuística apresenta distribuição de ambos os sexos de maneira semelhante, sendo 20 (51%) destes pacientes do sexo feminino e 19 (49%) do sexo masculino.

Figura 17: Gráfico de etnias de pacientes com IHPRF3. (12/39) Porto-riquenho, (08/39) Europeu, (04/39) Árabe, (03/39) Sírio, (02/39) Algeriano, (02/39) Brasileiro, (02/39) Marroquina, (02/39) Libanês, (01/39) Egípcio (01/39) Paquistanês, (01/39) hispânico e (01/39) Palestino.

Tabela 1 - Variantes patogênicas em pacientes com IHPRF3 descritos na literatura.

ID	Sexo	Idade no último exame	Consequência molecular	Região/ domínio afetado	Alteração c.DNA	Alteração molecular	ID Referência
P1	M	5 anos (falecido)	Sítio de <i>Splice</i>	TBC	c.1897+1G>A	NA	10DG1670 (IV-7) (ALAZAMI <i>et al.</i> , 2015)
P2	F	11 anos	Sítio de <i>Splice</i>	TBC	c.1897+1G>A	NA	10DG1670 (IV-6) (ALAZAMI <i>et al.</i> , 2015)
P3	M	9 anos (falecido)	<i>Frameshift</i>	Quinase	c.803_806del	p.Met268Argfs*26	Paciente 1 (II-1) (GUERREIRO <i>et al.</i> , 2016)
P4	M	16 anos	<i>Frameshift</i>	Quinase	c.803_806del	p.Met268Argfs*26	Paciente 2 (II-3) (GUERREIRO <i>et al.</i> , 2016)
P5	F	12 anos (falecida)	<i>Frameshift</i>	Quinase	c.803_806del	p.Met268Argfs*26	Paciente 3 (II-4) (GUERREIRO <i>et al.</i> , 2016)
P6	M	14 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	Família A (A-II-1) (CHONG <i>et al.</i> , 2016)

P7	F	4 anos	<i>Nonsense</i>	Entre Quinase e TBC	c.1363A>T	p.Lys455*	Família B (B-IV-4) (CHONG <i>et al.</i> , 2016)
P8	F	10 anos (falecida)	<i>Nonsense</i>	Entre Quinase e TBC	c.1363A>T	p.Lys455*	Família B (B-IV-6) (CHONG <i>et al.</i> , 2016)
P9	M	2 anos	<i>Missense</i>	TBC	c.1532G>A	p.Arg511His	Família C (C-II-1) (CHONG <i>et al.</i> , 2016)
P10	M	14 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	Família D (D-II-1) (CHONG <i>et al.</i> , 2016)
P11	M	5 anos	<i>Frameshift</i>	Entre Quinase e TBC	c.831_832ins TA	p.Pro278Ty rfs*18	2-1 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)
P12	M	11 anos	<i>Missense</i>	TBC	c.1652T>C	p.Leu551Pro	3-1 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)
P13	F	4 anos	Sítio de <i>splice</i> ; <i>Frameshift</i>	Quinase	c.2060-2A>G; 803_806delT GAA	p.[=];[Met2 68fsArg*26]	4-1 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)
P14	F	2 anos	Sítio de <i>splice</i> ; <i>Frameshift</i>	Quinase	c.2060-2A>G; 803_806delT GAA	p.[=];[Met2 68fsArg*26]	4-2 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)
P15	F	10 anos	Nonsense	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	5-1 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)

P16	M	12 anos	<i>Frameshift</i>	Entre Quinase e TBC	c.1370delA	p.Asn457T hrfs*15	6-1 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)
P17	F	3 anos	<i>Frameshift</i>	Entre Quinase e TBC	c.1370delA	p.Asn457T hrfs*15	6-2 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)
P18	M	6 anos	Sítio de <i>splice</i>	Quinase	c.455+4C>G	NA	7-1 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)
P19	F	12 anos	Nonsense	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	8-1 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)
P20	F	10 anos	<i>Frameshift</i> ; <i>Nonsense</i>	Entre Quinase e TBC ; Quinase	c.[(658+1_65 9- 1)_(2059+1_ 2060-1)del]; [376C>T],	p.[=];[Arg12 6*]	9-1 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)
P21	M	2 anos	<i>Frameshift</i> ; <i>Nonsense</i>	Entre Quinase e TBC ; Quinase	c.[(658+1_65 9- 1)_(2059+1_ 2060-1)del]; [376C>T]	p.[=];[Arg12 6*]	9-2 (BHOJ <i>et al.</i> , 2016)
P22	F	13 anos	<i>Frameshift</i>	TBC	c.1854delT	p.Pro618Glnfs*42	Probando 1 (MANDEL <i>et al.</i> , 2017)
P23	M	11 anos	<i>Frameshift</i>	TBC	c.1854delT	p.Pro618Glnfs*42	Probando 2 (MANDEL <i>et al.</i> , 2017)
P24	F	14 anos	<i>Frameshift</i> / <i>Nonsense</i>	Entre TBC e RHOD	c.2060_2235 del c. 2130C>G	p.Glu687Valfs*8 p.Tyr720*	F6331- 1 (MOREIRA, 2017)

P25	F	10 anos	<i>Frameshift/ Nonsense</i>	Entre TBC e RHOD	c.2060_2235 del c. 2130C>G	p.Glu687V alfs*8 p.Tyr720*	F6331- 4 (MOREIRA, 2017)
P26	M	15 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	126-2 (ORTIZ- GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2018)
P27	M	13 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	126-3 (ORTIZ- GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2018)
P28	M	13 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	126-4 (ORTIZ- GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2018)
P29	M	11 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	126-5 (ORTIZ- GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2018)
P30	M	18 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	126-6 (ORTIZ- GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2018)
P31	M	3 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	126-7 (ORTIZ- GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2018)
P32	M	5 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.376C>T	p.Arg126*	126-8 (ORTIZ- GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2018)
P33	F	5 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.753dup	p.Lys252*	Paciente 1

							(ZAPATA-ALDANA <i>et al.</i> , 2019)
P34	F	3 anos	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.753dup	p.Lys252*	Paciente 2 (ZAPATA-ALDANA <i>et al.</i> , 2019)
P35	F	7 anos (falecida)	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.304C > T	p.Gln102*	Paciente 1 (BECK-WÖDL <i>et al.</i> , 2018)
P36	F	11 anos (falecida)	<i>Nonsense</i>	Quinase	c.304C > T	p.Gln102*	Paciente 2 (BECK-WÖDL <i>et al.</i> , 2018)
P37	F	11 anos (falecida)	<i>Nonsense</i>	Entre TBC e RHOD	c.2060_2235 del	p.Glu687Valfs*8	----- (SUMATHIP ALA <i>et al.</i> , 2019)
P38	F	13 anos	<i>Frameshift</i>	Quinase	c.535_554del	p.Leu179ArgfsTer10	Probando 1 (SAREDI <i>et al.</i> , 2020)
P39	F	8 anos	<i>Frameshift</i>	Quinase	c.535_554del	p.Leu179ArgfsTer10	Probando 2 (SAREDI <i>et al.</i> , 2020)

4.2 Análise fenotípica

O espectro fenótipo variável da casuística de IHPRF3 abrange um total de 84 características físicas e neurológicas (Tabela 2) que estão presentes de maneira diversificada entre os 39 pacientes. Dessa maneira, cada indivíduo com deficiência de TBCK pode apresentar um conjunto bastante distinto de características quando comparado com outro indivíduo com alteração genética distinta no gene TBCK. A Tabela 1 abaixo resume todas as características fenotípicas avaliadas nos estudos da literatura relacionados aos 39 pacientes com IHPRF3.

Tabela 2 - Características fenotípicas presentes nos diferentes relatos de IHPRF3.

Estudos *												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Total
Número de Casos	2	3	5	11	2	2	7	2	2	1	2	39
Sexo (Masculino/Feminino)	1/1	2/1	3/2	5/6	1/1	0/2	7/0	0/2	0/2	0/1	0/2	19M/ 20F
Homozigoto/ Heterozigoto Composto	2/0	3/0	5/0	7/4	2/0	0/2	7/0	2/0	2/0	2/0	2/0	33/6
Deficiência Intelectual	2/2	3/3	5/5	11/11	2/2	2/2	7/7	2/2	2/2	1/1	2/2	39/39
Deficiência Global do Desenvolvimento	2/2	3/3	5/5	11/11	2/2	2/2	7/7	2/2	2/2	1/1	2/2	39/39
Deficiência no Desenvolvimento Motor	2/2	3/3	NA	5/11	2/2	NA	7/7	2/2	2/2	1/1	2/2	26/32
Deficiência no Desenvolvimento da Fala	2/2	3/3	NA	10/10	2/2	2/2	7/7	2/2	2/2	1/1	2/2	33/33
Regressão do Desenvolvimento	0/2	NA	4/5	1/11	NA	1/1	5/7	NA	NA	NA	0/2	11/28
Hipotonia Grave	2/2	3/3	5/5	7/11	2/2	0/2	7/7	2/2	2/2	1/1	2/2	33/39
Hipotonia Moderada	0/2	0/3	0/5	4/11	0/2	2/2	0/7	0/2	0/2	0/1	0/2	06/39
Reflexos Normais	NA	1/1	NA	3/3	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5/5
Reflexos Atrasados, Reduzidos ou Ausentes	2/2	1/1	5/5	6/6	1/1	NA	7/7	1/1	1/1	1/1	2/2	27/27
Reflexos Aumentados	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	4/4
Crises Epilépticas	2/2	3/3	4/5	3/11	1/1	1/2	7/7	1/2	2/2	1/1	2/2	27/38
Problemas na Visão	1/2	3/3	5/5	2/2	2/2	NA	NA	1/1	2/2	0/1	NA	16/18
Problemas na Respiração	NA	1/1	5/5	3/3	1/2	1/2	5/7	NA	2/2	1/1	NA	19/23

Dependência Ventilatória	0/2	1/1	4/4	3/11	NA	NA	5/7	NA	NA	NA	NA	13/25
G-Tube	NA	NA	5/5	NA	1/1	0/2	NA	NA	NA	NA	NA	5/7
Hipertrigliceridemia	NA	NA	2/2	NA	1/1	2/2	6/6	NA	NA	NA	NA	11/11
Osteoporose	NA	NA	4/4	NA	1/1	NA	4/6	NA	NA	NA	NA	9/11
Hipotermia	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5/7	NA	NA	NA	NA	5/7
Hipotireoidismo	1/1	NA	NA	NA	NA	2/2	3/6	NA	NA	NA	NA	6/9
Braqui/Plagiocefalia	NA	3/3	NA	NA	1/1	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	6/6
Puberdade Precoce	NA	3/3	NA	NA	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	4/4
Microcefalia	NA	NA	NA	1/1	1/1	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	3/3
Macrocefalia	NA	NA	NA	4/4	NA	NA	NA	0/2	NA	NA	2/2	6/8
Escoliose	NA	NA	NA	4/4	1/1	NA	NA	0/2	NA	NA	1/1	6/8
Bexiga Neurogênica	NA	NA	1/1	1/1	NA	NA	4/5	NA	NA	NA	NA	6/7
Autismo	NA	NA	NA	1/1	NA	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	3/3
Estreitamento Bitemporal	NA	NA	5/5	NA	1/1	2/2	7/7	0/2	NA	NA	NA	15/17
Sinófris	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	1/2	NA	NA	NA	2/3
Sobrancelhas Arqueadas	NA	NA	4/5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4/5
Olhos Profundos	NA	3/3	3/5	1/1	1/1	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	10/12
Ponte Nasal Alta	NA	NA	5/5	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6/6
Narinas Antevertidas	NA	NA	4/5	NA	1/1	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	7/8
Arco do Cupido Proeminente	NA	NA	5/5	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	7/7
Traços Faciais Grosseiros	NA	NA	3/5	3/3	NA	NA	5/7	NA	NA	NA	NA	11/15
Testa Inclínada	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	4/4
Macroglossia	NA	NA	2/5	2/2	NA	NA	7/7	2/2	2/2	NA	NA	15/18
Boca Aberta	NA	NA	NA	1/1	NA	2/2	NA	2/2	2/2	NA	2/2	9/9
Língua Fissurada	NA	1/1	1/1	NA	NA	NA	NA	1/2	2/2	NA	NA	5/6
Boca em Formato de Tenda	2/2	NA	NA	1/1	NA	2/2	NA	2/2	2/2	NA	2/2	11/11
Nariz Bulboso	2/2	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3/3
Palato Ogival	NA	NA	1/1	2/2	2/2	2/2	NA	NA	NA	NA	2/2	9/9
Pescoço Curto	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	2/2	2/2	NA	2/2	7/7
Braquimelia	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5/7	NA	NA	NA	NA	5/7
Hirsutismo	NA	NA	NA	2/2	NA	1/1	NA	1/1	NA	NA	1/1	5/5
Problemas na Audição	NA	NA	0/5	1/1	1/2	NA	NA	0/1	0/2	NA	NA	2/11
Sobrancelhas Grossas	NA	NA	NA	2/2	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3/3
Testa Larga	NA	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2
Pectus Excavatum	NA	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2
Filtro Labial Longo	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	3/3

Hiperplasia Gengival	NA	NA	2/5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/5
<i>Upward Slanted of Palpebral Fissures</i>	1/1	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2
Dobras Epicânticas	NA	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2
Sutura Metópica	NA	NA	NA	1/1	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2
Sinus Pré Auricular	NA	1/1	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2
Turricéfalia	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2
Transtorno Bipolar	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Dificuldades de Comportamento	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Idade Óssea Atrasada	NA	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2/2
Mandíbula Prognata	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Palato Fundo	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Fissura <i>Down Slanting</i>	NA	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Prega Palmar Única	NA	3/3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3/3
Persistência da Almofada Digital	NA	NA	NA	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	2/2
Dedos dos Pés Sobrepostos	NA	3/3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3/3
Dentes Espaçados	NA	NA	NA	NA	NA	2/2	NA	NA	NA	NA	NA	2/2
Braquidactilia	NA	NA	NA	NA	NA	1/2	NA	NA	NA	NA	NA	1/2
Anemia Perniciosa	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Candidíase Recorrente	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Eczema	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Icterícia ao Nascer	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Contraturas Leves	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Mamilos Invertidos	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Defeito do Septo Ventricular	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Insuficiência Adrenal Central	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Deficiência do Hormônio de Crescimento	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Cílios Longos	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Hipertireoidismo	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Sindactilia	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Clinodactilia	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Criptorquidia	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Diástase Abdominal	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1

Estenose Pulmonar	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Trombocitopenia	NA	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1
Dedos Largos	NA	NA	NA	1/1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1/1

Obs: Comorbidades pouco descritas na casuística estão marcadas em laranja

* A: (ALAZAMI *et al.*, 2015); B: (GUERREIRO *et al.*, 2016); C: (CHONG *et al.*, 2016); D: (BHOJ *et al.*, 2016); E: (MANDEL *et al.*, 2017); F: (MOREIRA, 2017); G: (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018); H: (ZAPATA-ALDANA *et al.*, 2019); I: (BECK-WÖDL *et al.*, 2018); J: (SUMATHIPALA *et al.*, 2019); K: (SAREDI *et al.*, 2020).

Devido a falta de um método uniforme de avaliação clínica dos pacientes com IHPRF3 por parte dos diferentes estudos na literatura, os dados fenotípicos foram coletados de maneira muito heterogênea dificultando a análise destes dados na presente pesquisa. Em vista disso, foram excluídas 40 comorbidades consideradas pouco descritas na casuística (Tabela 1, em laranja), descritas em apenas um ou dois pacientes, como é o caso de: pectus excavatum, sinus pré auricular e mandíbula prognata; essas características não fornecem dados suficientes para realizar análises adequadas para a presente pesquisa,. Por outro lado, características muito frequentes que estão presentes em mais de 90% da casuística foram excluídas do estudo, como é o caso da deficiência intelectual e a da deficiência no desenvolvimento global, características que foram relatadas em todos os pacientes com IHPRF3 e parecem fazer parte da expressão fenotípica desta síndrome independentemente da região do gene TBCK que está localizada a mutação.

Das 42 características selecionadas, as que se mostraram mais proeminentes na casuística de IHPRF3 foram: Hipotonia generalizada, vista majoritariamente na forma grave (33/39) mas também está presente de forma moderada em alguns pacientes (06/39); a deficiência do desenvolvimento da fala (33/33), sendo alguns indivíduos não verbais enquanto outras apresentavam apenas vocalizações; além da deficiência no desenvolvimento motor (26/32). Alterações nos reflexos neurológicos foram reportados em 36 pacientes, sendo a maioria destas alterações expressas como reflexos atrasados, reduzidos ou ausentes (27/27) enquanto uma minoria dos pacientes apresentava reflexos aumentados (04/04) ou normais (05/05), além disso, crises epiléticas (27/38) foram reportadas de maneira muito recorrente na casuística. Por outro lado, comorbidades como hipertrigliceridemia (11/11), osteoporose (9/11), hipotireoidismo (6/9) não se mostraram tão frequentemente quanto as outras características na casuística, porém foram reportadas em um número considerável de

pacientes com IHPRF3. As características dismórficas que se mostraram mais prevalentes em pacientes acometidos por esta condição foram estreitamento bitemporal (15/17), macroglossia (15/18), boca em formato de tenda (11/11), traços faciais grosseiros (11/15), olhos profundos (10/12), boca aberta (9/9), palato ogival (9/9), pescoço curto (7/7), arco do cupido proeminente (7/7), narinas antevertida (7/8) e escoliose (6/8).

4.3 Análise genotípica

Os 39 pacientes com IHPRF3 possuem alterações genéticas em homozigose (85%) e em heterozigose composta (15%) que afetam diferentes regiões de TBCK (Figura 18). A grande maioria das variantes presentes na casuística estão localizadas no domínio Quinase (62%), enquanto o restante das variantes estão distribuídas ao longo de outras três regiões em TBCK. Desse modo, 15% das alterações se encontram na região entre o domínio Quinase e o domínio TBC, 15% no domínio TBC e 8% na região entre o domínio TBC e o domínio RHOD; até o momento não foi reportada nenhuma variante localizada no domínio RHOD. Dessas alterações genotípicas, mais da metade resultam em mutações *nonsense* (51%), e a outra metade das alterações resultaram em maior parte em *frameshift* (33%), e em uma menor proporção variantes que alteram sítios de *splice* (10%) e a substituições não sinônimas do tipo *missense* (5%).

Figura 18: Localização das variantes genéticas em TBCK. Estão listadas todas as variantes *nonsense*, *frameshift* e *missense* encontradas nos pacientes. As variantes de sítio de *splice* estão representadas através de asteriscos. Todas as variantes são referentes ao transcrito NM_001163435.

As variantes genotípicas coletadas para este estudo resultaram num total de 17 variantes únicas (Tabela 3), que podem se apresentar em diferentes famílias na casuística. Logo, a análise destes dados permitiu concluir que a variante mais frequentemente observada na casuística foi a variante *nonsense* c.376C>T (p.Arg126*), encontrada em 11 famílias distintas (11/26; 42,3%), presente em um total de 13 pacientes todos provenientes de Porto Rico (P6, P10, P15, P19-P21, P26-P32; Tabela 1), o que representa 92% do total de porto-riquenhos desta casuística, sugerindo uma mutação fundadora nessa população (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

A segunda variante mais frequentemente reportada é uma deleção de 4 pares de bases (c.803_806del) encontrada em 2 famílias distintas (2/26; 7,7%) (em um total de 5 pacientes) resultando em uma alteração do quadro de leitura (p.Met268Argfs*26). Essa alteração está localizada no domínio Quinase e foi reportada pela primeira vez em um trio de irmãos europeus (P3, P4 e P5; Tabela 1) afetados gravemente com IHPRF3 (GUERREIRO *et al.*, 2016); em um segundo relato da literatura uma dupla de irmãs com IHPRF3 (P13 e P14; Tabela 1) (BHOJ *et al.*, 2016), também europeias, porém com um fenótipo um pouco mais brando que o trio anterior, apresentaram alterações em heterozigose composta no gene TBCK, sendo uma destas variantes a mesma vista no trio de irmãos europeus (c.803_806del), e a outra alteração em sítio de splice (c.2060-2A>G), ambas localizadas no domínio Quinase.

A terceira variante com recorrência (c.2060_2235del), foi reportada em outras 2 famílias (2/26; 7,7%). As pacientes brasileiras (P24 e P25; Tabela 1) avaliadas pelo CEGH-CEL possuem esta variante em heterozigose composta em TBCK c.[2060_2235del]; c.[2130C>G] ambas localizadas na região entre o domínio TBC e no domínio RHOD (MOREIRA, 2017). Esta variante (c.2060_2235del) que apresenta uma deleção de 175 pb no gene TBCK também foi reportada por um grupo de pesquisadores que descreveram um caso de 1997 (SUMATHIPALA *et al.*, 2019), no qual uma menina europeia (P37; Tabela 1) apresentava a mesma região deletada que as pacientes brasileiras, porém em homozigose.

As demais variantes de TBCK analisadas na casuística ainda não foram reportadas em outras famílias, sendo até o presente momento alterações exclusivas de um único núcleo familiar. Desse modo, as 14 variantes estão distribuídas entre 10 duplas de irmãos que apresentam as mesmas variantes entre si e 4 indivíduos de

famílias distintas que apresentam alterações em homozigose no gene TBCK não compartilhadas com os outros membros da casuística (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição das variantes de TBCK na casuística (heterozigotos compostos - em laranja).

Nº de Famílias	Alteração c.DNA	Alteração Molecular	IDs Pacientes	Consequência Molecular	Domínio/ Região
11	c. 376C>T	p. Arg126*	P6, P10, P15, P19, P20, P21 , P26-P32	<i>Nonsense</i>	Quinase
2	c. 803_806del	p. Met268Argfs*26	P3-P5, P13 e P14	<i>Frameshift</i>	Quinase
2	c. 2060_2235del	p. Glu687Valfs*8	P24, P25 e P37	<i>Frameshift</i>	Entre TBC e RHOD
1	c.1897+1G>A	/	P1 e P2	Sítio de <i>splice</i>	TBC
1	c.1363A>T	p.Lys455*	P7 e P8	<i>Nonsense</i>	Entre Quinase e TBC
1	c. 2060-2A>G	p. =	P13 e P14	Sítio de <i>splice</i>	Quinase
1	c.1370delA	p.Asn457Thrfs*15	P16 e P17	<i>Frameshift</i>	Entre Quinase e TBC
1	c. (658+1_659-1)(2059+1_2060-1)del	p.=	P20 e P21	<i>Frameshift</i>	Entre Quinase e TBC
1	c.1854delT	p.Pro619Glnfs*42	P22 e P23	<i>Frameshift</i>	TBC

1	c. 2130C>G	p. Tyr720*	P24 e P25	Nonsense	Entre TBC e RHOD
1	c.753dup	p.Lys252*	P33 e P34	Nonsense	Quinase
1	c.304C>T	p.Gln102*	P35 e P36	Nonsense	Quinase
1	c.535_554del	p.Leu179fs	P38 e P39	Frameshift	Quinase
1	c.1532G>A	p.Arg511His	P9	Missense	TBC
1	c.831_832insTA	p.Pro278Tyrfs*18	P11	Frameshift	Entre Quinase e TBC
1	c.1652T>C	p.Leu551Pro	P12	Missense	TBC
1	c.455+4C>G	/	P18	Sítio de <i>splice</i>	Quinase

4.4 Associação Genótipo-Fenótipo

Com o intuito de realizar uma pesquisa mais otimizada, indivíduos com alterações em heterozigose composta foram incluídos na classificação dos pacientes por região de localização das variantes ao longo de *TBCK* somente quando as variantes estivessem localizadas na mesma região. Logo, apenas quatro (P13, P14, P24, P25) de seis pacientes com alterações em heterozigose composta foram incluídos nas análises estatísticas (Tabela 4), pois possuem alterações na mesma região do gene: as irmãs europeias P13 e P14 possuem alterações no domínio Quinase; e, as irmãs brasileiras P24 e P25 possuem alterações na região entre TBC e RHOD. Por outro lado, pacientes com variantes em heterozigose composta em regiões distintas de *TBCK*, foram excluídos da pesquisa como é o caso de outras duas pacientes heterozigotas compostas (P20 e P21) que possuem alterações em diferentes regiões de *TBCK* (Tabela 4); uma das alterações está localizada na região entre o domínio Quinase e o domínio TBC, enquanto a outra alteração está no domínio Quinase; um fator o qual poderia ser conflitante na análise estatística, por isso os dados destas duas pacientes não foram incluídos na pesquisa de correlação genótipo-

fenótipo, sendo assim apenas 37 dos 39 pacientes com IHPRF3 foram selecionados para a realização do estudo de correlação genótipo e fenótipo.

Tabela 4 - Localização das variantes genéticas dos pacientes heterozigotos compostos com IHPRF3.

IDs Pacientes	Alteração c.DNA	Alteração Molecular	Domínio / Região
P13 e P14	c. 803_806del; c. 2060-2A>G	p. Met268Argfs*26; p. =	Quinase; Quinase
P20 e P21	c. 376C>T; c. (658+1_659-1)_(2059+1_2060-1)del	p. Arg126*; p. =	Quinase; Entre Quinase e TBC
P24 e P25	c. 2060_2235del; c. 2130C>G	p. Glu687Valfs*8; p. Tyr720*	Entre TBC e RHOD; Entre TBC e RHOD

Os 37 indivíduos selecionados foram agrupados em quatro grupos de acordo exclusivamente com localização de suas variantes distribuídas ao longo dos domínios e regiões de TBCK, desse modo os pacientes foram divididos em: domínio Quinase, entre Quinase e TBC, domínio TBC e entre TBC e RHOD (Tabela 5).

Tabela 5 - Agrupamento dos pacientes com IHPRF3 de acordo com a localização das variantes em TBCK

Domínio / Região	Número de Pacientes (%)
Domínio Quinase	23 (62%)
Entre Quinase e TBC	5 (14%)
Domínio TBC	6 (16%)
Entre TBC e RHOD	3 (8%)
Total	37 (100%)

A distribuição do número total de casos de acordo com a localização da variante de TBCK (Tabela 5) resulta na concentração de mais da metade dos pacientes (62%) com alterações em um único domínio (domínio Quinase) e menos da metade do total de pacientes (38%) com variantes localizadas em três regiões distintas: entre o domínio Quinase e TBC (14%), no domínio TBC (16%) e entre o domínio TBC e RHOD (8%). Desta forma, exceto pelo número de pacientes com mutações no domínio Quinase, há um número pequeno de pacientes distribuídos em cada um dos outros grupos; diante destes dados, o agrupamento inicial foi revisto e reformulado para testarmos de maneira mais adequada a hipótese deste projeto.

O novo agrupamento reorganizou os pacientes em dois grandes grupos (Tabela 6): um grupo Quinase (GQ) com 23 Pacientes com alterações localizadas no domínio Quinase, sendo 11 indivíduos do sexo feminino (2 - 13 anos) e 12 do sexo masculino (3 - 18 anos); e um grupo não Quinase (GNQ) com 14 pacientes reunindo aqueles indivíduos que possuem alterações localizadas entre o domínio Quinase e o domínio TBC; no domínio TBC; e entre o domínio TBC e RHOD, sendo 8 indivíduos do sexo feminino (3 - 14 anos) e 6 do sexo masculino (2 - 12 anos).

Tabela 6 - Agrupamento dos pacientes com IHPRF3 em Grupo Quinase e Grupo Não Quinase

Agrupamento de acordo com os domínios funcionais do TBCK	Número de Pacientes (%)
Grupo Quinase (GQ)	23 (62%)
Grupo Não Quinase (GNQ)	14 (38%)

Após o novo agrupamento dos pacientes em GQ e GNQ, ambos foram submetidos ao teste Qui-Quadrado de Pearson com intuito de verificar a existência de alguma correlação entre os 42 fenótipos distintos e a localização das diferentes variantes genóticas atribuídas nestes dois grupos. Das 42 características fenotípicas analisadas, apenas 18 comorbidades apresentaram dados em ambos os grupos Quinase e Não Quinase (Tabela 7); destas características fenotípicas, somente a hipotonia grave ($p=0,012$) e a macroglossia ($p=0,000$) mostraram diferenças entre os grupos analisados, e estão presentes de maneira mais predominante nos pacientes pertencentes ao grupo GQ do que aqueles que possuem alterações localizadas no domínio Quinase. Traços faciais grosseiros ($p=0,099$) se mostrou uma característica prevalente em pacientes do grupo GQ (81,8%) quando comparado com o grupo GNQ (33,3%); por outro lado, a característica narinas antevertidas ($p=0,064$) se mostrou prevalente no grupo GNQ (100%) e menos prevalente no grupo GQ (50%); no entanto, a frequência de ambas características não diferiu estatisticamente entre os grupos. Características fenotipicamente prevalentes como deficiência de desenvolvimento motor (17/21) e crises epiléticas (19/23) se mostraram mais presentes no grupo GQ, quando comparadas com o GNQ (deficiência do desenvolvimento motor - 7/9 e crises epiléticas 8/13), contudo as frequências de ambas comorbidades não apresentaram diferença estatisticamente significantes entre os grupos. As demais comorbidades analisadas apresentaram resultados que indicam a falta de correlação entre as características fenotípicas e a localização da mutação em pacientes com IHPRF3.

Tabela 7 - Análise estatística das características fenotípicas no grupo Quinase e no grupo Não Quinase

Comorbidade	Grupo Quinase (GQ) (n, %)		Grupo Não Quinase (GNQ) (n, %)		Valor p
Deficiência Motora	17/21	81%	7/9	77,8%	0,842
Regressão do Desenvolvimento	8/16	50%	3/7	30%	0,315
Hipotonia Grave	22/23	95,7%	9/14	64,3%	0,012
Crises Epilépticas	19/23	82,6%	8/13	61,5%	0,161
Problemas na Visão	9/9	100%	7/8	87,5%	0,274
Problemas na Respiração	12/14	85,7%	7/9	77,8%	0,624
Dependência Ventilatória	10/15	66,7%	3/8	37,5%	0,179
G-Tube	2/2	100%	4/6	66,7%	0,346
Osteoporose	6/8	75%	3/3	100%	0,338
Hipotireoidismo	3/6	50%	3/3	100%	0,135
Macrocefalia	4/6	66,7%	2/2	100%	0,346
Escoliose	3/5	60%	2/2	100%	0,290
Estreitamento Bitemporal	9/11	81,8%	6/6	100%	0,266
Sobrancelhas Arqueadas	2/2	100%	2/3	66,7%	0,361
Olhos Profundos	6/7	85,7%	4/5	80%	0,793
Narinas Antevertidas	1/2	50%	6/6	100%	0,064
Traços faciais Grosseiros	9/11	81,8%	1/3	33,3%	0,099
Macroglossia	15/15	100%	0/3	0%	0,000

5. Discussão

Os estudos de correlação genótipo-fenótipo envolvem a determinação do relacionamento entre a constituição genética de um indivíduo e a observação de um conjunto de características de interesse. Até o momento nenhum estudo de correlação genótipo-fenótipo em pacientes com a síndrome de IHPRF3 foi publicado na literatura, sendo este o primeiro estudo proposto para esta síndrome de fenótipo extremamente abrangente, por este motivo, o presente estudo é de grande valia para auxiliar a elaboração de um prognóstico mais preciso aos pacientes acometidos por esta condição.

O presente estudo analisou 39 pacientes de diferentes etnias com mutações de perda de função no gene *TBCK*, majoritariamente em homozigose e em menor proporção em heterozigose composta. Foram avaliadas um total de 84 características fenotípicas descritas e distribuídas de maneira heterogênea em cada paciente. No entanto, algumas destas características se apresentam de maneira prevalente na casuística, como é o caso da deficiência no desenvolvimento global e da deficiência intelectual, que da perspectiva exclusivamente fenotípica estão presentes em todos os pacientes, independente da alteração genotípica. Outras características que foram avaliadas em grande parte da casuística (82% à 97%) foram a deficiência do desenvolvimento da fala (33/33) com a maioria dos pacientes não-verbais ou apresentando vocalizações anormais, crises epiléticas (27/38), deficiência do desenvolvimento motor (26/32), e reflexos atrasados, reduzidos ou ausentes (27/27), características que supostamente fazem parte do conjunto padrão de comorbidades desta síndrome.

As características coletadas no presente estudo foram obtidas em sua maioria a partir de dados disponíveis na literatura distribuídos em diferentes artigos científicos, os quais não avaliaram os pacientes com IHPRF3 de maneira padronizada. Desse modo, não se obteve homogeneidade nos dados fenotípicos coletados, o que sugere que algumas características e comorbidades possam ter passado despercebidas pelos profissionais no momento do diagnóstico ou não terem sido consideradas relevantes para tais estudos. E, conseqüentemente dificultou a determinação de um *gestalt* compartilhado por pacientes com a síndrome de IHPRF3. Contudo, algumas características físicas se destacaram por se apresentaram com certa frequência em

uma parcela dos pacientes, como é o caso: estreitamento bitemporal (15/17), macroglossia (15/18), boca em formato de tenda (11/11), traços faciais grosseiros (11/15), olhos profundos (10/12), boca aberta (9/9), palato ogival (9/9), pescoço curto (7/7), arco do cupido proeminente (7/7) e narinas antevertidas (7/8). Por isso, seria interessante o estabelecimento de uma análise padronizada das características dismórficas aqui mencionadas e também a avaliação de outras comorbidades relatadas em pacientes com IHPRF3 porém não descritas em muitos casos, como: hipertrigliceridemia (11/11), osteoporose (9/11), hipotireoidismo (6/9), bexiga neurogênica (6/7), escoliose (6/8) e puberdade precoce (4/4). Existe a possibilidade desses pacientes não estarem sendo diagnosticados adequadamente, podendo sofrer com as consequências destas comorbidades ao decorrer de suas vidas. Portanto, o diagnóstico precoce dessas comorbidades auxiliaria no manejo dos pacientes, no fornecimento de tratamento adequado se necessário também na determinação do prognóstico da síndrome, consequentemente melhorando a qualidade de vida dos acometidos pela síndrome IHPRF3.

A insuficiência adrenal foi uma das comorbidades excluídas da análise estatística pois foi reportada em apenas um único indivíduo da casuística (P15) e seria interessante investigar se outros pacientes com IHPRF3 possuem esta insuficiência que é causada em sua maioria por defeitos genéticos em crianças e muitas vezes herdados de maneira autossômica recessiva (KAMRATH, 2020). Algumas comorbidades resultantes da insuficiência adrenal como hipotireoidismo (6/9), idade óssea atrasada (2/2), candidíase recorrente (1/1), anemia perniciosa (1/1) (KAMRATH, 2020) estão presentes na casuística, porém estes casos aparentemente não foram avaliados para a insuficiência adrenal. Assim como outras comorbidades mencionadas anteriormente, esta insuficiência pode não estar sendo avaliada e diagnosticada, o que pode ser crítico para o prognóstico dos pacientes, por isso seria interessante também a inclusão de exames para a avaliação da insuficiência adrenal em pacientes com IHPRF3. A regressão no desenvolvimento foi avaliada em 28 pacientes, porém somente 11 destes pacientes apresentaram algum nível de regressão; contudo a grande maioria dos estudos não especificam o critério de avaliação da regressão, o que pode ter sido distinto de estudo para estudo.

A grande maioria das variantes genotípicas presentes na casuística são de perda de função, o que geralmente é o esperado em doenças com padrão de herança recessivo como a IHPRF3. Especula-se que mutações de perda de função em geral não se situam de maneira preferencial em resíduos de aminoácidos específicos (BERGMANN *et al.*, 2003), pois a perda de função frequentemente é causada por mudanças no quadro de leitura e criação de códons de parada prematuros que levam a NMD dos transcritos truncados (FRISCHMEYER; DIETZ, 1999). Assim como ocorre com as variantes presentes na casuística de IHPRF3 que se distribuem por toda extensão de TBCK, a maioria localizada no domínio Quinase na região N-terminal de TBCK, enquanto o restante das variantes estão distribuídas ao longo de outras três regiões em TBCK. Das 17 mutações distintas relatadas, a maioria são do tipo *nonsense* (51%), gerando códons de parada prematuros; e a variante mais frequente (NM_001163435.2:c.376C>T:p.Arg126*) esta presente em 13 indivíduos porto-riquenhos de 11 famílias distintas, o que sugere uma mutação fundadora nessa população (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018). 88% (15/17) das variantes presentes na casuística estão distribuídas na região que abrange os dois primeiros domínios de TBCK (Quinase e TBC), assim afetando a tradução de TBCK quase por completo. É interessante salientar que as duas únicas mutações do tipo *missense* na casuística afetam o domínio TBC, indicando que este domínio pode ser a unidade funcional mais importante para o desenvolvimento cerebral, porém os mecanismos moleculares subjacentes ainda são desconhecidos (WU; LU, 2021); no entanto, um paciente com uma das variantes *missense* (P12) (NM_001163435.2:c.1532G>A:p.Arg511His) se mostrou como o menos afetado de onze pacientes avaliados por Bhoj *et al.*, devido a expressão fenotípica mais branda quando comparada com pacientes com variantes *nonsense*, *frameshift* e que alteram o sítio de *splice*. Logo, é possível que as variantes patogênicas *missense* não estejam sendo facilmente diagnosticadas, o que dificulta a identificação deste tipo de variante como causadora de doença (BHOJ *et al.*, 2016).

Verificou-se uma associação genótipo-fenótipo entre pacientes com alterações no domínio Quinase de TBCK e duas comorbidades, a hipotonia grave ($p=0,012$) e a macroglossia ($p=0,000$), as únicas correlações que apresentaram um resultado estatisticamente significativo na casuística. Por outro lado, duas outras características apresentaram valor p próximo a significância, como é o caso de traços faciais grosseiros ($p=0,099$) e narinas antevertidas ($p=0,064$), indicando que existe uma

grande probabilidade de que este resultado não tenha atingido um valor estatisticamente significativo e somente se aproximado de $p=0,05$, possivelmente devido aos poucos casos ainda avaliados e a falta de um protocolo uniforme na análise dessas características fenotípicas em casos de IHPRF3.

Os problemas na respiração (12/14 - GQ e 7/9 - GNQ) ($p= 0,624$) que englobam infecções respiratórias recorrentes e insuficiência respiratória crônica, são comorbidades que estão intimamente relacionadas a dependência ventilatória (10/15 - GQ e 3/8 - GNQ) ($p= 0,179$), a qual se refere a indivíduos submetidos a traqueostomia ou a uso de BIPAP (*Bilevel Positive Pressure Airway*) para melhoria da respiração. No grupo GQ a grande maioria dos pacientes necessitam de dependência ventilatória (10/15 - 66,7%) enquanto no grupo GNQ o número de pacientes reduz para metade (3/8 - 37,5%), o que supostamente indica que nos indivíduos de GNQ os problemas respiratórios se expressem de maneira mais branda, provavelmente não necessitando do uso de ventilação mecânica nestes indivíduos. Além disto, não se pode excluir o fato de que o aparecimento de problemas respiratórios podem se desenvolver conforme os indivíduos forem crescendo; este é o caso da casuística de 7 indivíduos com IHPRF3 avaliados por Ortiz González *et al.* com a mesma mutação no domínio Quinase, os quais 5 de 7 pacientes desenvolveram insuficiência respiratória crônica, 5 são dependentes ventilatórios e os 2 outros pacientes sem evidência de insuficiência respiratória são os mais novos da coorte (3 e 5 anos de idade). Seria interessante avaliar os pacientes por períodos maiores para observar a evolução do quadro clínico e assim determinar o manejo ideal para estas condições na síndrome. Problemas na visão (9/9 - GQ e 7/8 - GNQ) ($p= 0,274$) como por exemplo: redução da acuidade visual, estrabismo, nistagmo, deficiência visual cortical e catarata; foram comorbidades vistas em grande parte da casuística, porém distribuída de maneira similar em ambos os grupos. Existe a possibilidade desses problemas visuais não estarem sendo avaliados em muitos pacientes devido a gravidade do fenótipo apresentado pelos indivíduos, portanto seria de grande valia incluir uma avaliação oftalmológica minuciosa na síndrome de IHPRF3.

Algumas características e comorbidades não apresentaram resultado na análise estatística pois foram avaliadas em apenas um único grupo. Comorbidades que foram descritas apenas no grupo Quinase englobam: hipotermia (5/7),

braquimelia (5/7), língua fissurada (5/6), puberdade precoce (4/4), nariz bulboso (3/3) e sinófriso (2/3). Logo, seria interessante avaliar essas características em um número maior de indivíduos com IHPFR3, de ambos os grupos, para que se possa chegar a uma conclusão em relação à prevalência dessas comorbidades tanto em GQ como em GNQ.

O autismo foi uma das comorbidades pouco descritas, reportada somente em 3 pacientes que interessantemente possuem variantes localizadas apenas no grupo Não Quinase; 2 irmãs brasileiras com alterações entre o domínio TBC e o domínio RHOD e uma paciente europeia com alteração no domínio TBC. Contudo, esta comorbidade pode não ter sido diagnosticada no restante da casuística, pois todos os pacientes acometidos pela síndrome IHPRF3 apresentam deficiência intelectual e grande parte desses expressa a DI de maneira muito grave, o que pode mascarar o diagnóstico do autismo. É possível que o diagnóstico de autismo seja mais provavelmente concluído em casos mais brandos de IHPRF3, onde a deficiência intelectual não é tão proeminente.

Diferentemente do objetivo proposto pelo trabalho que busca verificar a existência de correlação entre a localização das variantes genóticas de TBCK em pacientes com IHPRF3 e o fenótipo apresentados pelos mesmos, interessantemente, uma possível correlação genótipo-fenótipo foi observada na literatura entre pacientes com variantes localizadas no mesmo domínio do gene. Duas irmãs europeias (P13 e P14) com alterações em heterozigose composta ambas localizadas no domínio Quinase de TBCK (NM_001163435.2:c.[2060-2A>G];[803_806del]:p.[=];[Met268Argfs*26]) apresentaram um fenótipo moderado e não progressivo, sem evidência de neuropatia e com ressonâncias magnéticas normais (BHOJ *et al.*, 2016), enquanto na mesma idade os pacientes porto-riquenhos com alterações em homozigose também no domínio Quinase (NM_001163435.2:c.376C>T:p.Arg126*) apresentaram um quadro clínico mais grave com anomalias nos estudos neurofisiológicos e fraqueza profunda (ORTIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Por isso, existe a necessidade de estudos que avaliem grau de gravidade fenotípico entre pacientes com mutações localizadas na mesma região do gene TBCK.

De maneira geral, um fator dificultante na análise foi a maneira em que os dados fenotípicos foram obtidos por diferentes grupos de pesquisa, compondo um conjunto de dados fenotípicos extremamente heterogêneos de paciente para paciente, o que era esperado pois a grande maioria dos estudos reportados previamente eram direcionados a estudos funcionais e não incluíam uma análise minuciosa do fenótipo abrangente da síndrome de IHPRF3. Por isso, futuramente, o resultado da presente análise poderá ser complementado conforme novos casos de IHPRF3 forem reportados na literatura, assim podendo chegar a novas conclusões que auxiliem a composição de um prognóstico para estes pacientes, bem como abordagens para manejo das comorbidades mais prevalentes da síndrome.

6. Conclusões:

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

A deficiência no desenvolvimento global, a deficiência intelectual e a hipotonia generalizada são características que compõem o fenótipo de todos os pacientes com IHPRF3 independentemente da localização da alteração em TBCK.

Não existe um *gestalt* característico da síndrome de IHPRF3, porém algumas características físicas como estreitamento bitemporal, olhos profundos, macroglossia, boca em formato de tenda e traços faciais grosseiros se mostraram presentes em vários indivíduos da casuística.

É necessária a avaliação de algumas comorbidades em específico como a hipertrigliceridemia, osteoporose, hipotireoidismo, bexiga neurogênica, escoliose, puberdade precoce e insuficiência adrenal nos pacientes com IHPRF3 com intuito de aprimorar o prognóstico da síndrome e fornecer tratamento adequado aos pacientes se necessário.

O autismo, reportado de maneira pouco frequente na casuística, deve ser avaliado com mais atenção nos pacientes com IHPRF3, pois pode estar se sobrepondo nos casos de DI muito grave e possui mais chances de ser detectado em casos mais brandos de IHPRF3.

A maioria das variantes genótípicas presentes na casuística estão localizadas no domínio Quinase, assim como a mutação fundadora dos porto-riquenhos (NM_001163435.2:c.376C>T:p.Arg126*) que foi a variante mais frequentemente observada na casuística.

A hipotonia grave ($p=0,012$) e a macroglossia ($p=0,000$) são comorbidades mais frequentes em pacientes com mutações localizadas no domínio Quinase do gene TBCK quando comparadas aos indivíduos com variantes em outras regiões de TBCK.

Pacientes com variantes *missense* aparentemente apresentam um quadro fenotípico mais brando quando comparados com pacientes com variantes *nonsense*, *frameshift* e que alteram sítio de *splice*, portanto pacientes com mutações *missense* em TBCK

podem não estarem sendo diagnosticados corretamente como portadores da síndrome de IHPRF3.

Necessita-se o estabelecimento de um questionário de avaliação padrão para indivíduos com IHPRF3, para que dessa maneira tenhamos como fornecer um prognóstico mais detalhado aos afetados e suas famílias, baseado num estudo de correlação genótipo-fenótipo mais preciso.

7.Referências bibliográficas:

ABOUNIT, Kadija; SCARABELLI, Tiziano M.; MCCAULEY, Roy B. Autophagy in mammalian cells. **World Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

ALAZAMI, Anas M. *et al.* Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. **Cell Reports**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 148–161, 2015.

AL-SAYED, Moeenaldeen D. *et al.* Mutations in NALCN cause an autosomal-recessive syndrome with severe hypotonia, speech impairment, and cognitive delay. **American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 93, n. 4, p. 721–726, 2013.

BARR, Francis; LAMBRIGHT, David G. Rab GEFs and GAPs. **Current Opinion in Cell Biology**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 461–470, 2010.

BECK-WÖDL, Stefanie *et al.* Homozygous TBC1 domain-containing kinase (TBCK) mutation causes a novel lysosomal storage disease – a new type of neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN15)? **Acta Neuropathologica Communications**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 145, 2018.

BENBROOK, D. M.; LONG, A. Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. **Experimental oncology**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 286–97, 2012.

BEN-SHACHAR, S. *et al.* Dominant versus recessive traits conveyed by allelic mutations - To what extent is nonsense-mediated decay involved? **Clinical Genetics**, [S. l.], v. 75, n. 4, p. 394–400, 2009.

BERGMANN, Carsten *et al.* Spectrum of mutations in the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD/PKHD1). **Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 76–89, 2003.

BHOJ, Elizabeth J. *et al.* Mutations in TBCK, Encoding TBC1-Domain-Containing Kinase, Lead to a Recognizable Syndrome of Intellectual Disability and Hypotonia. **American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 98, n. 4, p. 782–788, 2016.

BOUDEAU, Jérôme *et al.* Emerging roles of pseudokinases. **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 443–452, 2006.

CHONG, Jessica X. *et al.* Recessive Inactivating Mutations in TBCK, Encoding a Rab GTPase-Activating Protein, Cause Severe Infantile Syndromic Encephalopathy. **American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 98, n. 4, p. 772–781, 2016.

DECUYPERE, Jean-Paul; PARYS, Jan B.; BULTYNCK, Geert. Regulation of the Autophagic Bcl-2/Beclin 1 Interaction. **Cells**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 284–312, 2012.

FOUILLET, Antoine *et al.* ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy.

Autophagy, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 915–926, 2012.

FRISCHMEYER, Pamela A.; DIETZ, Harry C. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. **Human Molecular Genetics**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 1893–1900, 1999.

GUERREIRO, Rita J. *et al.* Mutation of TBCK causes a rare recessive developmental disorder. **Neurology Genetics**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. e76, 2016.

GUTIERREZ, M. G. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 117, n. 13, p. 2687–2697, 2004.

HAY, Nissim; SONENBERG, Nahum. Upstream and downstream of mTOR. **Genes and Development**, [S. l.], v. 18, n. 16, p. 1926–1945, 2004.

JAGER, S. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 117, n. 20, p. 4837–4848, 2004.

JIANG, Peidu; MIZUSHIMA, Noboru. Autophagy and human diseases. **Cell Research**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 69–79, 2014.

KAMRATH, Clemens. Beyond the adrenals: Organ manifestations in inherited primary adrenal insufficiency in children. **European Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 182, n. 3, p. C9–C12, 2020.

KHAJAVI, Mehrdad; INOUE, Ken; LUPSKI, James R. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. **European Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 1074–1081, 2006.

KIM, Joungmok; GUAN, Kun-Liang. Amino Acid Signaling in TOR Activation. **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 1001–1032, 2011

KIRISAKO, Takayoshi *et al.* Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. **Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 147, n. 2, p. 435–446, 1999.

KURIHARA, Yusuke *et al.* Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 5, p. 3265–3272, 2012.

LAPLANTE, Mathieu; SABATINI, David M. MTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, [S. l.], v. 149, n. 2, p. 274–293, 2012.

LEE, Jisun; GIORDANO, Samantha; ZHANG, Jianhua. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 441, n. 2, p. 523–540, 2012.

LE HIR, Hervé *et al.* The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. **EMBO Journal**, [S. l.], v. 19, n. 24, p.

6860–6869, 2000.

LI, Wen Wen; LI, Jian; BAO, Jin Ku. Microautophagy: Lesser-known self-eating. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 69, n. 7, p. 1125–1136, 2012.

LI, Yi-Xue *et al.* Identification of p27/KIP1 expression level as a candidate biomarker of response to rapalogs therapy in human cancer. **Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 88, n. 9, p. 941–952, 2010.

LIU, Yueli; YAN, Xiaoyi; ZHOU, Tianhua. TBCK Influences Cell Proliferation, Cell Size and mTOR Signaling Pathway. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. e71349, 2013.

LOEWITH, Robbie; HALL, Michael N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. **Genetics**, [S. l.], v. 189, n. 4, p. 1177–1201, 2011.

MAIURI, M. Chiara *et al.* Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 741–752, 2007.

MANDEL, Hanna *et al.* TBCK-related intellectual disability syndrome: Case study of two patients. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, [S. l.], v. 173, n. 2, p. 491–494, 2017.

MENZIES, Fiona M.; FLEMING, Angeleen; RUBINSZTEIN, David C. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 345–357, 2015.

MIZUSHIMA, Noboru; KOMATSU, Masaaki. Autophagy: Renovation of cells and tissues. **Cell**, [S. l.], v. 147, n. 4, p. 728–741, 2011.

MOREIRA, Danielle. **Múltiplas abordagens para determinar os fatores genéticos que contribuem para o ASD Multiple approaches to determine ASD genetic factors Múltiplas abordagens para determinar os fatores genéticos que contribuem para o ASD Multiple approaches to determine A.** 2017. - University of São Paulo, [s. l.], 2017.

ONODERA, Jun; OHSUMI, Yoshinori. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 280, n. 36, p. 31582–31586, 2005.

ORTIZ-GONZÁLEZ, Xilma R. *et al.* Homozygous boricua TBCK mutation causes neurodegeneration and aberrant autophagy. **Annals of Neurology**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 153–165, 2018 c.

PAN, Xiaojing *et al.* TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. **Nature**, [S. l.], v. 442, n. 7100, p. 303–306, 2006.

SAREDI, Simona *et al.* Myopathic changes associated with psychomotor delay and seizures caused by a novel homozygous mutation in <scp> TBCK </scp>. **Muscle & Nerve**, [S. l.], p. mus.26907, 2020.

SCHEEFF, Eric D. *et al.* Structure of the Pseudokinase VRK3 Reveals a Degraded Catalytic Site, a Highly Conserved Kinase Fold, and a Putative Regulatory Binding Site. **Structure**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 128–138, 2009.

SCHMELZLE, Tobias; HALL, Michael N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, [S. l.], v. 103, n. 2, p. 253–62, 2000.

SHAMSELDIN, Hanan E. *et al.* Mutations in UNC80, Encoding Part of the UNC79-UNC80-NALCN Channel Complex, Cause Autosomal-Recessive Severe Infantile Encephalopathy. **American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 98, n. 1, p. 210–215, 2016.

SMITH, Audrey *et al.* A familial dysmorphic condition with hypotonia, seizures and precocious puberty. **Clinical Dysmorphology**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 161–164, 2008.

SUMATHIPALA, Dulika *et al.* 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**, [S. l.], 2019.

SZATMÁRI, Zsuzsanna; SASS, Miklós. The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators: A review. **Autophagy**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1154–1166, 2014.

TSUKADA, Miki; OHSUMI, Yoshinori. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 333, n. 1–2, p. 169–174, 1993.

WANG, Zhong *et al.* Role of autophagy in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage. **Journal of Molecular Neuroscience**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 192–202, 2012.

WU, Jin *et al.* A Long Type of TBCK Is a Novel Cytoplasmic and Mitotic Apparatus-Associated Protein Likely Suppressing Cell Proliferation. **Journal of Genetics and Genomics**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 69–72, 2014.

WU, Jin; LU, Guanting. Multiple functions of TBCK protein in neurodevelopment disorders and tumors (Review). **Oncology Letters**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 1–8, 2021.

WULLSCHLEGER, Stephan; LOEWITH, Robbie; HALL, Michael N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, [S. l.], v. 124, n. 3, p. 471–484, 2006.

ZAFFAGNINI, Gabriele; MARTENS, Sascha. Mechanisms of Selective Autophagy. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 428, n. 9, p. 1714–1724, 2016.

ZAPATA-ALDANA, Eugenio *et al.* Further delineation of TBCK - Infantile hypotonia with psychomotor retardation and characteristic facies type 3. **European journal of medical genetics**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 273–277, 2019.