



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Investigação genética de casos de deficiência
intelectual em populações consanguíneas do
sertão paraibano**

Thalita Cristina Figueiredo Cunha

JOÃO PESSOA

2015

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB
Núcleo de Estudos em Genética e Educação – NEGE
Ponto focal: Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Thalita Cristina Figueiredo Cunha

**Investigação genética de casos de deficiência intelectual em
populações consanguíneas do sertão paraibano**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 06/07/2015

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Cristina dos Santos

JOÃO PESSOA
2015

C972i Cunha, Thalita Cristina Figueiredo.
Investigação genética de casos de deficiência intelectual em populações consanguíneas do sertão paraibano / Thalita Cristina Figueiredo Cunha.- João Pessoa, 2015.
76f. : il.
Orientadora: Silvana Cristina dos Santos
Dissertação (Mestrado) - UEPB/NEGE-UFPB
1. Biotecnologia. 2. Consanguinidade. 3. Deficiência intelectual. 4. Exoma. 5. *MED25*. 6. *IMPA1*.

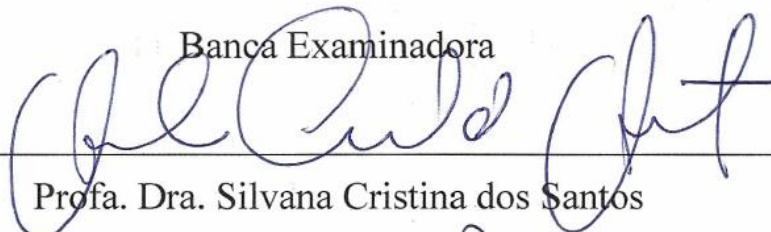
UFPB/BC

CDU: 60(043)

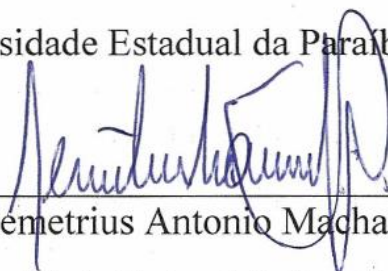
Investigação genética de casos de deficiência intelectual em populações consanguíneas do sertão paraibano

Thalita Cristina Figueiredo Cunha

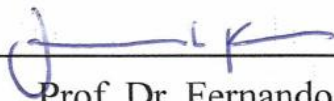
Banca Examinadora



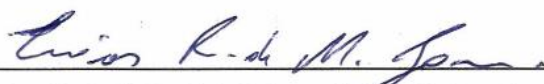
Prof. Dra. Silvana Cristina dos Santos
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB



Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo
Universidade Federal da Paraíba - UFPB



Prof. Dr. Fernando Kok
Universidade de São Paulo - USP



Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes
Universidade Federal da Paraíba - UFPB



Prof. Dr. Mathias Weller
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Às famílias envolvidas neste estudo, que prestaram apoio irrestrito e,
mesmo com todas as limitações da vida,
não perdem a esperança.

AGRADECIMENTOS

À inestimável colaboração dos agentes comunitários de saúde participantes deste estudo, pacientes e seus familiares. Eles me ensinaram muito sobre a vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Silvana Santos, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, que me fez crescer muito como pessoa e como profissional.

Ao Prof. Dr. Fernando Kok por realizar a avaliação clínica dos pacientes e colaborar na escrita dos artigos científicos. Um exemplo de profissional a ser seguido.

À Profa. Dra Mayana Zatz por sempre me abrir as portas do seu laboratório para realizar os experimentos que foram fundamentais para a concretização desta tese.

Aos neurologistas, André Pessoa, Paulo Nóbrega e Anderson Brandão, pela colaboração nas ações de genética comunitária e avaliação clínica de dezenas de pacientes.

Ao bioinformáta, Dr. João Kitajima, por sua colaboração fundamental para a concretização deste trabalho.

Ao meu grande amigo, Bruno Chaussê, por toda a parceria na vida e no mundo acadêmico, desde o início da nossa graduação em Ciências Biológicas.

Aos amigos de São Paulo, que tornaram muito mais fácil e divertido o árduo trabalho de bancada. Especialmente, Natale Cavaçana e Naila Lourenço, que além da ajuda para realizar os experimentos, me acolheram em suas casas durante as várias idas a São Paulo.

Aos integrantes do Núcleo de Estudos Genéticos e Educação – NEGE (UEPB), Thiago Pequeno, Karolinne Monteiro, Fernando Lopes, Shirley Lima, Aluska Matias, Thyago Wanderley, Allysson Allan, Roberta Smania-Marques por compartilharem a vida acadêmica. Ao Ednno Santos Almeida e Josicleide Calixo, pelas experiências vividas nos sertões. Em especial, Uirá Souto, por toda ajuda nos experimentos, pelas discussões científicas e pela amizade.

Às agências de fomento à pesquisa (CNPq, CAPES e FAPESP, FAPESQ) e à Universidade Estadual da Paraíba (PROPESQ), pelo apoio financeiro.

Ao meu noivo, Eduardo Freire, por todo carinho, companheirismo e paz transmitida, sua companhia tornou mais leve a minha vida.

À minha mãe, Fátima Figueiredo, minha grande incentivadora. Obrigada pela dedicação a mim conferida, educação e por estar sempre ao meu lado, mesmo nos momentos difíceis.

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar
pelo menos outros dez.”*

George Bernard Shaw

RESUMO

Uma parte das populações do Nordeste brasileiro está relativamente isolada geograficamente e mantém, há várias gerações, a tradição de casamentos consanguíneos. Esses dois fatores associados (isolamento e endocruzamento) elevam o risco de nascimento de pessoas com deficiência intelectual com herança genética autossômica recessiva. O objetivo deste trabalho foi determinar as causas genéticas da deficiência intelectual em duas grandes famílias consanguíneas do sertão paraibano. Em 2012, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo epidemiológico para determinar a contribuição de fatores genéticos na determinação das deficiências em seis municípios do sertão paraibano selecionados previamente por apresentarem elevada taxa de consanguinidade. As famílias que apresentavam repetições de indivíduos com doenças neurodegenerativas e/ou deficiência intelectual (DI) foram convocadas pelos agentes comunitários de saúde para uma primeira triagem, realizada pelos biólogos geneticistas, a fim de selecionar pacientes que apresentavam deficiência por prováveis causas genéticas. No total, foram triados 276 pacientes, sendo que, 109 foram selecionados para avaliação médica com neurologistas. Após a avaliação médica, duas famílias com múltiplos indivíduos acometidos por duas diferentes formas de DI de herança autossômica recessiva foram selecionadas para investigação clínico-genética. O estudo de ligação para determinar regiões em homozigose foi realizado com o uso da técnica de *array* de SNPs. Posteriormente, foi feito o sequenciamento do exoma completo de um indivíduo afetado de cada família. Variantes potencialmente deletérias detectadas em regiões em homozigose e que não estavam presentes em controles brasileiros e em banco de dados mundiais, foram objetos de uma análise mais aprofundada e feito a análise de co-segregação através do sequenciamento de Sanger. A primeira família estudada, a família A, possui sete adultos com DI sindrômica. O fenótipo inclui testa alta, prognatismo, queixo proeminente e ponta do nariz saliente, além da DI grave. O estudo de ligação apontou duas regiões com LOD *scores* máximos = 3,234, uma região de 26 Mb no cromossomo 2 (2p12 - q11.2) e uma região de 4,0 Mb no cromossomo 19 (19q13.32 - q13.33). O sequenciamento do exoma revelou uma variante em homozigose (c.418C>T, p.Arg140Trp) no gene *MED25* (subunidade 25 do complexo mediador), predita como deletéria por diferentes softwares (Polyphen, Provean, Mutation Taster e SIFT). O complexo mediador está envolvido na regulação da transcrição de quase todos os genes dependentes da RNA polimerase II. Mutações deletérias nos genes *MED12*, *MED17*, *MED23* e, recentemente, outra mutação no *MED25*, têm sido associadas com DI. Já a segunda família estudada, a família B, possui nove adultos afetados, descendentes de quatro relações consanguíneas entre primos de primeiro grau, com DI grave não-sindrômica. O estudo de ligação apontou uma região de 20,7 Mb no cromossomo 8 (8q12.3-q21.2) com LOD *score* = 3,11. O sequenciamento do exoma identificou uma variante deletéria em homozigose no gene inositol monofosfatase1 (*IMPA1*), que consiste em uma duplicação de 5 pares de bases (c.489_483dupGGGCT), levando a uma mutação do tipo *frameshift* (p.Ser165Trpfs*10). O produto do gene *IMPA1* é uma enzima responsável pela etapa final da biotransformação dos segundos mensageiros inositol trifosfato e diacilglicerol, e até o momento, apesar de apresentar importantes funções fisiológicas, não havia fenótipo clínico atribuído a esse gene. A partir deste estudo, foi possível desenvolver teste diagnóstico com triagem por enzima de restrição e perspectiva de tratamento terapêutico para os casos associados ao *IMPA1*.

Palavras chave: consanguinidade; deficiência intelectual; exoma; *MED25*; *IMPA1*.

ABSTRACT

A part of the populations in Northeastern Brazil are relatively isolated geographically and these populations maintain the tradition of consanguineous marriages for generations. These two factors (isolation and inbreeding) increase the risk of birth of people with autosomal recessive intellectual disabilities. The objective of this study was to determine the genetic causes of intellectual disabilities in two large consanguineous families of Paraíba backlands. In 2012, we conducted an epidemiological study to investigate the contribution of genetic factors in determining the deficiencies in six municipalities of Paraíba previously selected by presenting high consanguinity rate. Families who had patients with neurodegenerative disorders and/or intellectual disabilities (ID) were invited by community health agents for a first screening realized by biologists in order to select patients with deficiency probably caused by genetic mutations. In total, 276 patients were screened, of which, 109 were selected for medical evaluation with neurologists. After medical evaluation, two families with multiple affected individuals in two different forms of autosomal recessive intellectual disability were selected for clinical and genetic research. We performed the linkage study using SNPs array analysis to determine homozygous regions. Subsequently, the whole exome sequencing (WES) of one affected individual of each family was sequenced. Potentially deleterious variants detected in regions of homozygosity-by-descent which were not present in Brazilian population controls or in exomes of global online databases were subject to further scrutiny and segregation analysis by Sanger sequencing. Family A has seven adult siblings with syndromic ID. Phenotype includes tall forehead, prognathism, prominent chin, very large and overhanging nose tip. Homozygosity-by-descent analysis found a 4.0 Mb region in 19q13.32-q13.33 (lod score: 3.24). WES disclosed a homozygous variant (c.418C>T, p.Arg140Trp) in mediator complex subunit 25 (*MED25*), predicted as deleterious by Provean, Mutation Taster, PolyPhen-2 and SIFT. *MED25* is a component of the Mediator complex, involved in regulation of transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Deleterious mutations in *MED12*, *MED17*, *MED23* and recently after our publication another mutation in the *MED25* have been associated with ID. Family B has nine affected adults descending from four closely related first-cousin couples affected by severe non-syndromic ID. Homozygosity-by-descent analysis disclosed a 20.7 Mb region in 8q12.3-q21.2 (lod score: 3.11). WES identified a homozygous deleterious variant in inositol monophosphatase1 gene (*IMPA1*), consisting of a 5 bp duplication (c.489_493dupGGGCT) leading to frameshift (p.Ser165Trpfs*10). *IMPA1* gene product is responsible for the final step of biotransformation of inositol triphosphate and diacylglycerol, two second messengers, and up to now, despite its many physiological functions, no clinical phenotype has been assigned to this gene dysfunction. From this study, it was possible to develop diagnostic test by restriction enzyme and therapeutic perspective for cases associated with *IMPA1*.

Key words: consanguinity; intellectual disability; exome; *MED25*; *IMPA1*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAMR	Associação americana de retardo mental
ACS	Agentes comunitários de saúde
ADAT3	Proteína adenosine deaminase - RNAt específico 3
ANK3	Proteína anquirina 3
ARID	Deficiência intelectual autossômica recessiva
ATF6α	Fator 6 ativador da transcrição
CC2D1A	Do inglês, <i>Coiled-Coil And C2 Domain Containing 1A</i>
CDK8	Quinase dependentes de ciclinas 8
CID 10	Classificação Internacional de Doenças 10
CNVs	Variação no número de cópias
CRADD	Proteína adaptadora de sinalização de receptor com domínio de morte
CRBN	Proteína cereblon
CycC	Ciclina C
DAG	diacilglicerol
DATASUS	Departamento de informática do sistema único de saúde
DI	Deficiência intelectual
DIAR	Deficiência intelectual autossômica recessiva
DI-NS	Deficiência intelectual não-sindrômica
DIS	Deficiência intelectual sindrômica
dNTP	Desoxinucleotídeo
DSM-IV	Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais
ExAC	Do inglês, Exome Aggregation Consortium
FBXO31	Proteína F-Box 31
FMN2	Proteína formina 2
FMR1	Proteína 1 do retardo mental do X frágil
GPT2	Enzima Transaminase glutâmico pirúvica 2
GLuR6	Receptor de glutamate 6
GRIK2	Receptor ionotrópico de glutamato, caianato 2
HERC2	Do inglês, <i>HECT And RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase</i> 2

HNF4α	Fator nuclear do hepatócito 4 α
ID	Deficiência intelectual
IMPA1	Inositol monofosfatase 1
IP3	1,4,5-trifosfato
iPS	Células-tronco pluripotentes induzidas
KAR	Receptor de cainato
KPTN	Proteína ligante de actina – <i>Kaptein</i>
LOD	Do inglês, logarithm (base 10) of odds
MAN1B1	Proteína alfa-manosidade 1
MeCP2	Proteína 2 de ligação a metal-CpG
MED	Complexo mediador
MED12	Subunidade 12 do complexo mediador
MED13	Subunidade 13 do complexo mediador
MED17	Subunidade 17 do complexo mediador
MED23	Subunidade 23 do complexo mediador
MED25	Subunidade 25 do complexo mediador
METTL23	Enzima Metiltransferase <i>Like</i> 23
NDST1	Enzima N-desacetilase/N-sulfotransferase 1
NSUN2	Do inglês, <i>NOP2/Sun RNA Methyltransferase Family</i>
OMIM	Herança mendeliana no homem online
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polymerase
PEA3	Fator de transcrição ETs
PGAP1	Do inglês, <i>Post-GPI Attachment To Proteins 1</i>
PI	Fosdatidilinositol
PLP	Potenciação de longo prazo
PRSS12	Enzima serina protease 12
QI	Quociente de Inteligência
SIAB	Sistema de informação da atenção básica
SLC6A17	Transportador 17 de aminoácidos neutros
SNP	Polimorfismo de base única
Sox9	Fator de transcrição condrogênico
SPOAN	Paraplegia espástica com atrofia óptica e neuropatia
PSF	Programa de Saúde da Família

ST3GAL3	Do inglês, <i>ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 3</i>
TAF2	Do inglês, <i>TAF2 RNA Polymerase II, TATA Box Binding Protein (TBP)-Associated Factor, 150kDa</i>
TECR	Enzima 2,3-trans-enoil-CoA redutase
TFIID	Fator de transcrição para RNA polimerase II D
TRAPPC9	Do inglês, <i>Trafficking Protein Particle Complex 9</i>
TTI2	Do inglês, <i>TELO2 Interacting Protein 2</i>
TUSC3	Gene candidato 3 a supressor tumoral

LISTA DAS FIGURAS

- FIGURA 1.** Ativação da iniciação da transcrição em eucariotos por recrutamento do Complexo Mediador (A) e estrutura do Complexo Mediador de humanos (B).....28
- FIGURA 2.** Ciclo do inositol, inibição do lítio e fontes de inositol para a célula.....31
- FIGURA 3.** Mapa do estado da Paraíba.....35
- FIGURA 4.** Corresponde a *Figure 1* do Artigo 1: Family pedigree: individuals with intellectual disability are represented in filled symbols and half-filled symbols indicate heterozygous individuals.....42
- FIGURA 5.** Corresponde a *Figure 2* do Artigo 1: Facial features of affected individuals: tall forehead, prognatism, prominent chin and very large and overhanging nose tip.....42
- FIGURA 6.** Corresponde a *Figure 3* do Artigo 1: a Mutation in MED25..... 43
- FIGURA 7.** Corresponde a *Figure 1* do Artigo 2: The six generations pedigree of family represented six consanguineous branches.....48
- FIGURA 8.** Corresponde a *Figure 2* do Artigo 2: Mutation in *IMPA1*.....49
- FIGURA 9.** Corresponde a *Supplementary Figure 1* do Artigo 2: Mutation in *IMPA1* cosegregated with disease in the family.....52
- FIGURA 10.** Corresponde a *Supplementary Figure 2* do Artigo 2: Magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy analysis of patient (V-17) and a healthy control.....57

FIGURA 11. Esquema demonstrando o sítio de restrição da enzima *BseYI* e o padrão de bandas gerado a partir da digestão enzimática.....62

FIGURA 12. Gel em poliacrilamida com padrão de bandas geradas pela digestão enzimática com a endonuclease BseYI.....63

LISTA DOS QUADROS

QUADRO 1. Etiologia da deficiência intelectual.....	21
QUADRO 2. Genes associados à deficiência intelectual autossômica recessiva.....	25
QUADRO 3. Corresponde a <i>Supplementary Table 1</i> do Artigo 2: Variants identified in linkage region.....	58
QUADRO 4. Corresponde a <i>Supplementary Table 2</i> do Artigo 2: Myo-inositol measurements in urine and plasma.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Deficiência Intelectual.....	19
2.2. Fatores etiológicos da deficiência intelectual.....	20
2.3. Bases genéticas da deficiência intelectual.....	22
2.4. Funções dos genes associados à deficiência intelectual.....	27
2.4.1. O Gene <i>MED25</i>	28
2.4.2. O Gene <i>IMPA1</i>	30
2.5. Avanços nos estudos genéticos da deficiência intelectual.....	31
3. HIPÓTESE DE TRABALHO.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
4.1. Objetivo geral.....	34
4.2. Objetivos específicos.....	34
5. METODOLOGIA COMPLEMENTAR.....	35
5.1. Prospecção das famílias selecionadas para estudo.....	35
5.2. Aspectos éticos.....	36
5.3. Extração de DNA.....	36
5.4. Ensaio de microarranjos de DNA e cálculo de lod <i>scores</i>	37
5.5. Triagem da mutação no gene <i>IMPA1</i> por enzima de restrição.....	37
6. RESULTADOS.....	39
6.1. ARTIGO 1: Homozygous missense mutation in MED25 segregates with syndromic intellectual disability in a large consanguineous family.....	41
6.2. ARTIGO 2: A homozygous loss-of-function mutation in inositol monophosphatase 1 (<i>IMPA1</i>) causes severe intellectual disability.....	47
7. RESULTADO COMPLEMENTAR.....	62
7.1. Diagnóstico com enzima de restrição da deficiência intelectual associada ao gene <i>IMPA1</i>	62
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXO.....	76

1. INTRODUÇÃO

As uniões consanguíneas são bastante frequentes nos estados do Nordeste brasileiro. Estudos realizados em meados do século passado mostraram que, em média, 9% dos casamentos ocorriam entre casais aparentados (FREIRE-MAIA, 1957; FREIRE-MAIA, 1989) e essas estimativas não foram reduzidas ao longo dos anos. Em 2009, pesquisadores do Núcleo de Estudos em Genética e Educação (NEGE) da Universidade Estadual da Paraíba estabeleceram parceria com 39 municípios do sertão paraibano e entrevistaram 20.462 casais para levantamento de informações sobre a frequência de uniões consanguíneas, o resultado apontou uma taxa que variou de 6% a 41% (WELLER *et al.*, 2012).

A tradição de casamentos consanguíneos está associada ao maior risco de nascimento de crianças portadoras de doenças genéticas. Contudo, pouco se conhece a respeito das doenças genéticas que afetam as populações do Nordeste brasileiro. Tal desconhecimento inviabiliza o apoio terapêutico e a assistência adequada aos portadores dessas enfermidades.

Em 2012, diante dessa problemática, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo epidemiológico para determinar a contribuição de fatores genéticos na determinação das deficiências em seis municípios do sertão paraibano, selecionados previamente por apresentarem elevada taxa de consanguinidade e maior porcentagem de indivíduos com deficiência considerando dados do SIAB/DATASUS (Bom Sucesso, Brejo dos Santos, Catolé do Rocha, Belém do Brejo do Cruz, São José do Brejo do Cruz e Brejo do Cruz). As famílias que apresentavam indivíduos com doenças neurodegenerativas e/ou deficiência intelectual foram convocadas pelos agentes comunitários de saúde para uma primeira triagem, realizada pelos biólogos geneticistas, a fim de selecionar pacientes que apresentavam deficiência por prováveis causas genéticas. No total, foram triados 276 pacientes, sendo que, 109 foram selecionados para avaliação médica com três neurologistas que atuam na área de neurogenética. Neste trabalho, duas famílias com indivíduos acometidos por duas diferentes formas de deficiência intelectual de herança autossômica recessiva foram selecionadas para investigação genética.

A deficiência intelectual (DI) resulta de alterações no desenvolvimento e/ou funcionamento cerebral, causada tanto por fatores genéticos quanto fatores ambientais, como distúrbios na gestação, problemas no parto ou na vida após o nascimento. Um dos

maiores desafios dos pesquisadores da área, até o presente momento, é identificar os fatores genéticos causais associados à DI. A base genética da DI é extremamente heterogênea e suspeita-se que o número de genes associados a DI autossômica recessiva (DIAR) pode chegar a mais de mil (ROPERS, 2010). Atualmente, descritos no principal banco de dados de doenças mendelianas, o OMIM (do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*), há apenas 26 genes associados a essa condição.

Identificamos e descrevemos, nesta pesquisa, duas novas mutações genéticas como causa de DIAR. Os resultados foram apresentados no formato de artigos científicos. No primeiro deles foi descrita a família A, que possui sete indivíduos afetados por uma forma de deficiência intelectual sindrômica associada à mutação no gene *MED25* (*Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 25*). O MED25 faz parte do Complexo Mediador, que está envolvido na regulação da transcrição de quase todos os genes dependentes da RNA polimerase II (MALIK e ROEDER, 2005). Já no segundo artigo, foi descrita a família B, que apresenta nove indivíduos com deficiência intelectual associada à mutação no gene *IMPA1* (*Inositol monophosphatase1*), o produto desse gene é a enzima IMPase1, que ocupa uma função pivô nos mecanismos homeostáticos do mio-inositol intracelular, e portanto, tem papel essencial na transdução de sinais celulares (RUGGIERO et al., 1994). Anteriormente, nenhum dos dois genes havia sido associado à deficiência intelectual.

O conhecimento produzido a partir deste trabalho pode ser usado para orientar políticas públicas e para definir a necessidade de oferta de serviços especializados na área de Genética Médica no Nordeste brasileiro, tendo em vista que esses serviços estão concentrados nos estados do Sudeste. A partir da identificação das causas genéticas associadas às duas doenças, é possível oferecer testes genéticos tanto para diagnóstico quanto para a tomada de decisões reprodutivas em populações de risco. E, no caso da família B, há a perspectiva de tratamento a partir da suplementação oral de mio-inositol, uma substância de baixo custo e de ampla disponibilidade, para avaliar se há benefício no comportamento e no desempenho cognitivo em indivíduos com mutação na enzima *IMPA1*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

A Deficiência Intelectual (DI), segundo a Associação Americana de Psiquiatria (2000), caracteriza-se por uma função intelectual significativamente abaixo da média, demonstrada por um quociente de inteligência (QI) igual ou inferior a 70, associada a limitações adaptativas com manifestação antes dos 18 anos de idade. Tais limitações devem ocorrer em, pelo menos, duas áreas de habilidades, quer seja a comunicação, o autocuidado, a vida no lar, a adaptação social, a saúde e segurança, o uso de recursos da comunidade ou funções acadêmicas, lazer e trabalho.

A DI afeta de 1 a 3% da população mundial (EMERSON, 2007) e é um dos problemas de desenvolvimento neuropsicomotor mais comum em crianças e adolescentes, acometendo indivíduos de distintas classes sociais e culturas (LEONARD e WEN, 2002). Apesar da sua ocorrência global, tende a haver maior prevalência de DI em áreas de nível socioeconômico mais baixo (DURKIN, 2002; EMERSON, 2007), e essa discrepância é provavelmente devido a fatores ambientais (DURKIN *et al.*, 1998; EMERSON, 2007). No Brasil, tanto a estimativa de prevalência de DI quanto a determinação dos fatores etiológicos são pouco conhecidos devido a inúmeros fatores, como a ausência de serviços médicos especializados e a pobreza da população.

A classificação da DI costuma ser feita de acordo com o funcionamento adaptativo do indivíduo, isto é, como a pessoa enfrenta efetivamente as obrigações comuns da vida e o grau de independência pessoal de acordo com a sua faixa etária, bem como, sua inserção na sociedade. De acordo com o manual DSM-IV e CID 10, é possível classificar a DI em quatro níveis de gravidade, conforme descrito a seguir:

a) Leve: os indivíduos desenvolvem habilidades sociais e de comunicação, têm mínimo prejuízo nas áreas sensório-motoras, geralmente adquirem habilidades sociais e profissionais adequadas para um custeio mínimo das próprias despesas, mas podem precisar de supervisão, orientação e assistência, especialmente quando submetidos a estresse social. Com apoio apropriado, podem viver sem problemas na comunidade, de modo independente ou supervisionado.

b) Moderada: a maioria dos indivíduos com este nível de DI adquire habilidades de comunicação durante os primeiros anos da infância, mas com atraso. Com moderada supervisão, podem cuidar de si mesmos. Há dificuldades no

reconhecimento de convenções sociais. Na idade adulta, a maioria é capaz de executar trabalhos não qualificados ou semiquilificados e adaptam-se bem à vida na comunidade, geralmente supervisionados.

c) Grave: durante os primeiros anos da infância, os indivíduos adquirem pouca ou nenhuma fala comunicativa. Em relação aos cuidados pessoais, devem ter supervisão e possuem o mínimo de entendimento, conseguindo atender e interagir com outros ou fazer algumas atividades domésticas.

d) Profunda: durante os primeiros anos da infância, os afetados apresentam prejuízos significativos no funcionamento sensório-motor. Ocorrem limitações graves quanto aos cuidados pessoais, continência, comunicação e mobilidade.

Além da classificação por nível de gravidade, a DI pode ser também agrupada em deficiência intelectual sindrômica (DIS) e deficiência intelectual não-sindrômica (DI-NS). Tradicionalmente, a DI-NS é definida pela presença da DI como característica clínica exclusiva; contudo, dificilmente se descarta a associação com outras anomalias neurológicas mais sutis e transtornos psiquiátricos, devido ao comprometimento cognitivo dos pacientes (KAUFMANN *et al.*, 2010). Em DIS, os pacientes apresentam uma ou várias características clínicas ou comorbidades como, por exemplo, na Síndrome de Down. Nesse caso, os indivíduos, além de DI, também apresentam dismorfismo facial característico e maior risco de sofrer defeitos cardíacos congênitos, doença do refluxo gastroesofágico, otites recorrentes, apneia do sono obstrutiva e disfunções da glândula tireoide.

A Deficiência Intelectual resulta de alterações no desenvolvimento e/ou funcionamento cerebral, causada por fatores genéticos, distúrbios na gestação, problemas no parto ou na vida após o nascimento. Um dos maiores desafios dos pesquisadores da área, até o presente momento, é identificar os fatores causais associados à DI.

2.2. FATORES ETIOLÓGICOS DA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

Em até 60% dos casos de crianças com DI, não se consegue estabelecer claramente o que causou a deficiência. A exposição ambiental a substâncias teratogênicas, vírus ou radiação, como também traumas ou lesões ocorridas durante o período pré, peri ou pós natal, por exemplo, podem afetar o desenvolvimento neuropsicomotor. A Associação Americana de Retardo Mental (AAMR, 2006) considera quatro categorias de fatores de risco para DI: biomédicos, sociais,

comportamentais e educacionais, com ocorrências no período pré-natal, perinatal e pós-natal, como pode ser observado no quadro 1.

Quadro 1 – Etiologia da deficiência intelectual

Período	Fatores Biológicos	Fatores Sociais	Fatores Comportamentais	Fatores Educacionais
Pré-natal	<ul style="list-style-type: none"> - Distúrbios cromossômicos - Distúrbios de gene único - Doenças maternas 	<ul style="list-style-type: none"> - Má-nutrição materna - Violência doméstica materna - Falta de pré-natal 	<ul style="list-style-type: none"> - Uso de drogas ou álcool pelos pais 	<ul style="list-style-type: none"> - Deficiência cognitiva dos pais
Perinatal	<ul style="list-style-type: none"> - Prematuridade - Lesão no nascimento - Distúrbios neonatais 	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de acesso aos cuidados no nascimento - Desnutrição 	<ul style="list-style-type: none"> - Abandono da criança 	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de preparo para serem pais
Pós-natal	<ul style="list-style-type: none"> - Meningoencefalite - Distúrbios convulsivos - Distúrbios degenerativos 	<ul style="list-style-type: none"> - Falta de interação social - Desnutrição 	<ul style="list-style-type: none"> - Abuso ou negligência - Violência doméstica 	<ul style="list-style-type: none"> - Incapacidade intelectual dos pais - Diagnóstico tardio - Intervenção tardia - Educação inadequada - Apoio da família inadequado

Dentre os fatores ambientais associados à DI, um dos mais preocupantes é a exposição do indivíduo ao álcool *in utero* que pode causar a síndrome do álcool fetal. A exposição ao álcool no primeiro trimestre de gravidez afeta a organogênese e o desenvolvimento craniofacial do feto, enquanto o desenvolvimento do sistema nervoso central é influenciado durante toda a gravidez, devido à maturação continuada dos neurônios (THACKRAY e TIFFT, 2001). Por isso, essa doença acarreta um conjunto de anormalidades físicas, comportamentais e cognitivas. Ela é a causa mais comum de DI nos países desenvolvidos e sua prevalência pode ser reduzida com ações de prevenção de abuso de álcool dirigidas às mulheres antes da gravidez.

Outro fator associado à DI, também passível de prevenção, é a desnutrição. No início da vida pós-natal, a desnutrição reduz a taxa de desenvolvimento do sistema nervoso central, ocasionando diminuição no número de neurônios, córtex cerebral mais fino, mielinização deficiente, e várias alterações nos dendritos (BENÍTEZ-BRIBIESCA *et al.*, 1999). Por outro lado, alguns distúrbios metabólicos específicos, como a fenilcetonúria, podem levar ao desenvolvimento da DI. Em 1934, foi mostrado que a dieta pobre em fenilalanina poderia prevenir o desenvolvimento da DI associada à fenilcetonúria (FØLLING, 1934 *apud* CENTERWALL e CENTERWALL, 2000). Essa descoberta permitiu o esclarecimento da fisiopatologia, diagnóstico e o tratamento da doença, incentivando outras pesquisas sobre DI.

A determinação da etiologia da DI tem várias implicações para a família dos afetados. O diagnóstico frequentemente ajuda a família a compreender o prognóstico da doença, a definir o tratamento mais apropriado caso esteja disponível e a estimar o risco de recorrência, principalmente, quando a DI for causada por fatores genéticos. Além do comprometimento financeiro, cuidar de pessoas com DI pode ter efeitos sociais e emocionais substanciais na família do afetado. Os pais e irmãos de indivíduos com DI podem apresentar estresse crônico devido às interações sociais estigmatizadas e à carga de cuidados que pode durar a vida toda do dependente (TOPPER *et al.*, 2011). Portanto, o diagnóstico preciso é fundamental para orientar as famílias de indivíduos com DI (KABRA e GULATI, 2003).

2.3. BASES GENÉTICAS DA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

Com o desenvolvimento das técnicas citogenéticas e, principalmente, devido à revolução acarretada pelas tecnologias de nova geração de sequenciamento de DNA, abriu-se um amplo leque para o estudo das mutações associadas à DI. A maioria das formas graves de DI é causada por defeitos genéticos, que variam desde anomalias cromossômicas a mutações de ponto e até mesmo alterações epigenéticas (NAJMABADI *et al.*, 2011; TOPPER *et al.*, 2011).

As aberrações citogenéticas microscopicamente visíveis, como aneuploidias, duplicações, deleções, inversões e rearranjos, causam 15% dos casos de DI, sendo que a trissomia do cromossomo 21, ou Síndrome de Down, é a doença mais prevalente (LEONARD e WEN, 2002). A partir da tecnologia de *microarray*, foi possível identificar inúmeros casos de perda e ganho de segmentos de cromossomos que não

eram visíveis microscopicamente. As estimativas atuais apontam que cerca de 15% dos casos de DI ocorrem devido a presença de variações no número de cópias de DNA (CNVs) submicroscópicas (ZAHIR e FRIEDMAN, 2007).

Dentre as doenças monogênicas, o primeiro gene identificado associado à DI foi o *FMR1* (do inglês, *fragile X mental retardation protein 1*), cuja alteração causa a síndrome do X frágil. Essa doença tem incidência de um em cada 5.000 homens e explica cerca de 0,5% dos casos de DI (COFFEE *et al.*, 2009). Os pacientes apresentam dismorfismo facial, como face mais alongada e orelhas grandes, além de hiperextensibilidade das articulações, pés planos e palato alto e ogival. O gene *FMR1* codifica a proteína FMRP que possui ação reguladora da transcrição-tradução (BRANCHI *et al.*, 2003). No cromossomo X, há outro gene notável associado à DI, o *MeCP2* (do inglês, *methyl CpG binding protein 2*). Mutações nesse gene são responsáveis pela síndrome de Rett, uma causa comum de DI no sexo feminino. Atualmente, existem outras formas de DI sindrômica causadas por diferentes mutações no *MeCP2* que afetam ambos os sexos (OMIM). A proteína MeCP2 está associada à cromatina tanto ativando quanto reprimindo a transcrição gênica e é necessária para a maturação dos neurônios (SWANBERG *et al.*, 2009).

Em virtude da prevalência maior de homens afetados por DI na população mundial e a existência de vários genes do cromossomo X já associados a esse fenótipo, muitos estudos focaram na investigação desse cromossomo. Esperava-se que muitos casos de DI fossem solucionados a partir da identificação de mutações em genes encontrados no cromossomo X; no entanto, atualmente, estima-se que as formas de DI ligadas ao cromossomo X representam apenas 10% dos casos, com cerca de 100 genes descritos associados a essa condição. Isto significa que a grande maioria dos defeitos genéticos deve ser autossômica (ROPERS, 2010; OMIM).

As formas graves de DI de herança autossômica dominante são menos frequentes, pois grande parte dos indivíduos afetados não se reproduz. Assim, a maioria das mutações causadoras de DI autossômica dominante é do tipo *de novo* (RAUCH *et al.*, 2006; ROPERS, 2010; NAJMABADI *et al.*, 2011). Essas alterações frequentemente se originam em células germinativas de um dos genitores ou no ovo já fertilizado; por isso, não têm histórico de repetição familiar. Essas mutações imprimem uma característica esporádica à ocorrência da doença, o que dificulta a determinação da etiologia genética desses casos (KING *et al.*, 2006).

A elucidação das causas genéticas de casos de DI autossômica recessiva (DIAR) avançou pouco se comparada aos achados relacionados às pesquisas sobre o cromossomo X. Parte dessa dificuldade se deve ao fato de que a maioria dos centros de pesquisa em genética médica está localizada em países desenvolvidos onde as famílias são geralmente pequenas e não consanguíneas. Os casos isolados dificultam a investigação genética. Diferentemente das formas de DI síndrômica ligada ao X, nas quais há dismorfismos bem característicos, os casos de DIAR não síndrômicos causados por diferentes mutações gênicas são clinicamente indistinguíveis (ROPERS, 2010).

Até 2007, no banco de dados de doenças mendelianas (OMIM), apenas quatro genes associados à DIAR tinham sido identificados. Para isso, foi utilizada a estratégia de investigação de famílias consanguíneas com múltiplos afetados, associada ao estudo de ligação (*linkage*) e sequenciamento de genes candidatos. O estudo de ligação permite a identificação de intervalos genômicos em homozigose, regiões onde são selecionados genes candidatos para sequenciamento pelo método tradicional de Sanger. Essas regiões críticas podem apresentar centenas até milhares de genes, tornando o processo de identificação das mutações associadas à DI muito demorado e caro. Por essa razão, vários estudos ficaram limitados a encontrar apenas regiões candidatas.

Esse cenário vem mudando desde o surgimento da tecnologia de sequenciamento de nova geração para obtenção da sequência completa do exoma. Essa técnica de captura, sequenciamento e análise de 1% do genoma que contem informações para codificação de proteínas (exons) foi aplicada, pela primeira vez, em 2009, para a descoberta de mutações patogênicas (NG *et al.*, 2009). Desde então, tem impulsionado a descoberta de novos genes associados às doenças genéticas, especialmente aqueles que causam as DIAR.

Se em 2007 havia apenas quatro genes associados à DI, em junho de 2015, esse número passou a 26, segundo dados do OMIM (quadro 2). Todos esses genes foram identificados em famílias consanguíneas, sendo a grande maioria deles encontrados em famílias do Oriente Médio. No entanto, esses achados representam apenas poucas “estrelas” na constelação de possíveis genes associados à DIAR, pois foi estimado que o número de genes causadores dessa condição pode chegar a mais de mil (ROPERS, 2010).

Quadro 2. Genes associados à deficiência intelectual autossômica recessiva

Gene	Função	Mutação	Família	Referência
<i>ST3GAL3</i>	formação do glicocálice: atua no processo de comunicação celular	c.38C>A / p.Ala13Asp c.1108G>T / p.Asp379Tyr c.958G>C / p.Ala320Pro	Iraniana Iraniana Palestina	Hu <i>et al.</i> , 2011. Edvardson <i>et al.</i> , 2013.
<i>PGAP1</i>	biossíntese deglicosilfosfatidilinositol: glicolípido que ancora diversas proteínas à superfície celular	c.589_591delCTT / p.Leu197del	Síria	Murakami <i>et al.</i> , 2014.
<i>CRBN</i>	regula a expressão de canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância em regiões do cérebro associadas a memória e aprendizagem	c.1274C>T / Arg419Ter	Sectária	Higgins <i>et al.</i> , 2004.
<i>PRSS12</i>	plasticidade neuronal	c.1350_ACGTdel	Argelina	Molinari <i>et al.</i> , 2002.
<i>NSUN2</i>	estabiliza o emparelhamento entre códon e anticódon para traduzir corretamente o RNAm	c.679C>T / p.Gln227Ter c.1114C>T / p.Gln372Ter c.2035G>A / Gly679Arg	Iraniana Iraniana Paquistanesa	Abbasi-Moheb <i>et al.</i> , 2012. Khan <i>et al.</i> , 2012.
<i>MED23</i>	transcrição dos genes dependentes da RNA polimerase II	c.1850G>A / Arg617Gln	Argelina	Hashimoto <i>et al.</i> , 2011.
<i>GRIK2</i>	receptor ionotrópico de glutamato, um neurotransmissor excitatório	deleção dos éxons 7 e 8 p. Arg198Ter	Iraniana	Motazacker <i>et al.</i> , 2007. Córdoba <i>et al.</i> , 2015.
<i>TTI2</i>	sinalização de respostas a danos no DNA	c.1307T>A / p.Ile436Asn	Argelina	Langouet <i>et al.</i> , 2013.
<i>TUSC3</i>	transporte do íon magnésio através da membrana plasmática	c.163C>T / p.Gln55Ter	Iraniana	Garshasbi <i>et al.</i> , 2011.
<i>TAF2</i>	contribui com a associação de fatores de transcrição à região promotora dos genes dependentes da RNA polimerase II	c.557C>G / p.Thr186Arg c.1517C>A / p.Pro416His	Árabe	Hellman-Aharony <i>et al.</i> , 2013.
<i>TRAPPC9</i>	diferenciação de células neuronais	c.1423C>T / p.Arg475Ter c.1422C>T / p.Arg475Ter c.1423C>T / p.Arg475Ter c.1708C>T / p.Arg570Ter	Árabe Paquistanesa Síria Tunisiana	Mochida <i>et al.</i> , 2009. Mir <i>et al.</i> , 2009. Abbou Jamra <i>et al.</i> , 2011. Philippe <i>et al.</i> , 2009.
<i>MAN1B1</i>	degradação e eliminação de glicoproteínas defeituosas	c.1189G>A / p.Glu397Lys c.1000C>T / p.Arg334Cys	Paquistanesa Iraniana	Rafiq <i>et al.</i> , 2011.

Continuação **Quadro 2. Genes associados à deficiência intelectual autossômica recessiva**

<i>ANK3</i>	papel importante na geração de potencial de ação	c.10995delC / p.Thr3666LeufsTer2	Paquistanesa	Iqbal, Z <i>et al.</i> , 2013.
<i>KIAA1033</i>	polimerização da actina em endossomas e processos de transporte múltiplo endossomal	c.3956C>G / p.Pro1018Arg	Árabe	Ropers <i>et al.</i> , 2011.
<i>CRADD</i>	indução de apoptose	c.382G>C / p.Gly128Arg	Menonita	Puffenberger <i>et al.</i> , 2012.
<i>HERC2</i>	degradação de proteínas defeituosas	c.1781C>T / p.Pro594Leu	Amish	Puffenberger <i>et al.</i> , 2012.
<i>FBXO31</i>	desenvolvimento dos dendritos e migração neuronal	c.847_852delinsA / p.Cys283AsnfsTer81	Paquistanesa	Mir <i>et al.</i> , 2014.
<i>METTL23</i>	regulação da expressão de fatores de transcrição	c.169_172delCACT / p.His57ValfsTer11 c.281_285delAAGAT / p.Gln94HisfsTer6 c.391C>T / p.Gln133Ter	Iemenita Austriaca Paquistanesa	Reiff <i>et al.</i> , 2014. Bernkopf <i>et al.</i> , 2014.
<i>TECR</i>	síntese de ácidos graxos de cadeia longa	c.545C>T / p.Pro182Leu	Hutterite	Caliskan <i>et al.</i> , 2011.
<i>ADAT3</i>	desaminação da adenosina na posição 34 em inosina no RNAt	c.382G>A / p.Val128Met	Árabe	Alazami <i>et al.</i> , 2013.
<i>KPTN</i>	dinâmica da actina e morfogênese neuronal	c.776C>A / p.Ser259Ter	Amish	Baple <i>et al.</i> , 2014.
<i>CC2D1A</i>	diferenciação de células neuronais, plasticidade neuronal, e desenvolvimento do cérebro	deleção de 3,589 nucleotídeos (intron 13 ao 16)	Árabe	Basel-Vanagaite <i>et al.</i> , 2006.
<i>NDST1</i>	biossíntese de heparan sulfato: importante sinalizador celular	c.2126G>A / p.Arg709Gln c.1918T>C / p.Phe640Leu	Iraniana Turca	Reuter <i>et al.</i> , 2014.
<i>FMN2</i>	organização do citoesqueleto e polaridade celular	c.1394_1395insC /p.Ala466GlyfsTer483 c.2515delA / p.Thr839ArgfsTer848	Egípcia Paquistanesa	Law <i>et al.</i> , 2014.
<i>SLC6A17</i>	transporte de neurotransmissores	c.1898C>G / p.Pro633Arg	Iraniana	Iqbal <i>et al.</i> , 2015.
<i>GPT2</i>	atuação na transaminação que origina piruvato e glutamato	c.459 C>G / p.Ser153Arg	Judia	Celis <i>et al.</i> , 2015

2.4. FUNÇÕES DOS GENES ASSOCIADOS À DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

A elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da DI tem sido alvo de amplo leque de pesquisas. Ao descrever uma via metabólica comum, mesmo sem a identificação da mutação genética associada a ela, é possível desenvolver testes com marcadores bioquímicos específicos que podem servir para diagnóstico clínico (KAUFMAN *et al.*, 2010). Por outro lado, a identificação de uma mutação genética em um determinado gene pode permitir ou facilitar tanto a oferta de testes diagnósticos quanto a elucidação desses mecanismos.

O aprendizado e a memória envolvem alterações na eficácia, estrutura e número das sinapses (KANDEL, 2001). Há várias décadas, sabe-se que a DI está associada a anormalidades na forma e ramificação dos dendritos (KAUFMANN e MOSER, 2000). Portanto, uma função biológica que é muitas vezes mencionada nos trabalhos sobre a causa de DI é a formação e a transmissão das sinapses (GUILMATRE *et al.*, 2009; HAMDAN *et al.*, 2009). Por exemplo, um dos primeiros genes associados à DIAR foi o *GRIK2*, que codifica a proteína GLuR6, uma subunidade do receptor de cainato (KAR). Os KARs são receptores ionotrópicos de glutamato que responde ao neurotransmissor excitatório glutamato. Eles são altamente expressos no cérebro, particularmente no hipocampo, onde o GLuR6 foi encontrado como modulador da potenciação de longo prazo (PLP) em modelos de camundongos (CONTRACTOR *et al.*, 2001). A PLP no hipocampo está envolvida com o mecanismo de formação da aprendizagem e memória (FEDULOV *et al.*, 2007).

Os genes relacionados à DI estão envolvidos em vários processos biológicos como a transcrição e tradução do DNA, degradação de proteínas, processamento do RNAm, metabolismo energético, indução de apoptose, transporte de moléculas, entre outras. No quadro 2 são mostrados os genes que já foram associados com DI até o momento. Este número, entretanto, vem crescendo rapidamente em virtude do uso das técnicas de sequenciamento de nova geração para identificação de mutações. Em muitos desses estudos não foi possível ainda elucidar claramente o mecanismo que gerou as consequências clínicas a partir de defeitos envolvendo processos celulares básicos. Isso reflete a complexidade do sistema nervoso central, que o torna particularmente vulnerável aos danos.

2.4.1. O GENE *MED25*

A proteína codificada pelo gene *MED25* pertence ao Complexo Mediador (MED), coativador necessário para a regulação da transcrição de quase todos os genes dependentes da RNA polimerase II.

As proteínas do Complexo Mediador desempenham uma função mediadora entre os fatores de transcrição específicos (ativadores ou repressores) e a maquinaria basal de transcrição, contendo a RNA polimerase II e os fatores de transcrição gerais. A principal função do Mediador está associada ao aumento da eficiência na formação do complexo de pré-iniciação bem como ao recrutamento da RNA polimerase II, TFIID e outros fatores de transcrição gerais para a região promotora dos genes sob o seu controle, por meio da interacção direta com esses elementos (NAPOLI *et al.*, 2012) (figura 1A).

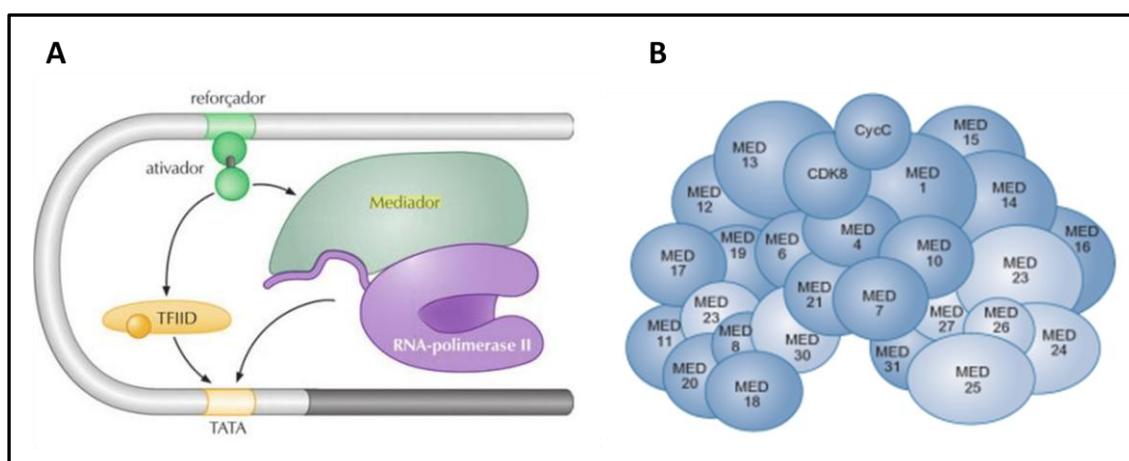


Figura 1. Ativação da iniciação da transcrição em eucariotos por recrutamento do Complexo Mediador (A) e estrutura do Complexo Mediador de humanos (B). (Fonte: WATSON *et al.*, 2006, ADAPTADO).

O Complexo Mediador é um conjunto de proteínas organizadas em módulos, cada um contendo diferentes subunidades (figura 1B). Esses módulos são chamados de cabeça, intermediário, cauda e regulatório, sendo que cada um desempenha funções específicas. A cauda do Complexo Mediador, no qual inclui o produto do gene *MED25*, interage com os ativadores transcripcionais (HERBIG *et al.*, 2010). O módulo intermédio transfere o sinal da cauda para a cabeça do Complexo Mediador após a sua ligação com os fatores de transcrição específicos (LEWIS e REINBERG, 2003). Por sua vez, o módulo da cabeça é o que contacta e transfere o sinal de indução para a RNA

polimerase II (SOUTOURINA *et al.*, 2011). O domínio regulatório do complexo é composto pelas subunidades MED12, MED13, uma quinase dependente de ciclina CDK8 e uma ciclina designada por CycC (BOURBON, 2008). Esse módulo influencia a regulação da transcrição de uma maneira que é capaz de inibir ou estimular a expressão genética (MALIK e ROEDER, 2005).

Por causa do seu papel como um integrador e processador da informação regulatória, o Complexo Mediador representa um ponto final em uma variedade de importantes vias de sinalização do desenvolvimento (MALIK e ROEDER, 2010; SPAETH *et al.*, 2011). Consistente com esse papel, estudos genéticos com diferentes modelos animais (*zebrafish*, drosófilas, camundongos e *Caenorhabditis elegans*) evidenciaram o papel desse complexo com o desenvolvimento e diferenciação celular (NAPOLI *et al.*, 2012). A inativação genética do módulo do Complexo Mediador responsável pela comunicação direta com a RNA polimerase II resulta em letalidade embrionária precoce em camundongo, indicando que esse complexo por si só seria necessário para a viabilidade celular (TUDOR *et al.*, 1999). Mutações pontuais nas subunidades individuais foram associadas à diversas doenças humanas, entre elas as malformações congênitas, doenças neurodegenerativas e câncer (SPAETH *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, estudos funcionais mostraram a importância da subunidade MED25 na ativação da transcrição a partir da associação a diferentes fatores de transcrição, tais como: fator nuclear do hepatócito 4 α (HNF4 α), fator condrogênico (Sox9), membros do grupo PEA3 e o fator 6 ativador da transcrição (ATF6 α) (NAKAMURA *et al.*, 2011; RANA *et al.*, 2011; SELA *et al.*, 2013; VERGER *et al.*, 2013). A análise da expressão do gene *MED25* em camundongos do tipo selvagem detectou níveis mais elevados de expressão no cerebelo, gânglios, córtex cerebral e nervo óptico, indicando um importante papel do MED25 no sistema nervoso (LEAL *et al.*, 2009).

Recentemente, Basel-Vanagaite *et al.* (2014) identificaram uma mutação pontual em homozigose (c.116A>G [p.Tyr39Cys]) no *MED25* em sete indivíduos como causa de uma síndrome genética caracterizada por deficiência intelectual grave, microcefalia, malformações nos olhos, coração e palato. Mutações em outros componentes do Complexo Mediador já foram associadas à deficiência intelectual. Variantes não sinônimas no *MED12* foram associadas às síndromes Ohdo, Lujan e Opitz-Kaveggia; formas sindrômicas de DI ligadas ao X (RISHEG *et al.*, 2007; SCHWARTZ *et al.*, 2007; Vulto-van Silfhout *et al.*, 2013). A variante c.1112T>C [p.Leu371Pro] no *MED17*

foi associada à DI síndrômica com atrofia cerebelar (KAUFMANN *et al.*, 2010). Já a mutação c.1850G>A [p.Arg617Gln] no *MED23* foi identificada como causa de DI não síndrômica em uma família consanguínea argelina com cinco indivíduos afetados (HASHIMOTO *et al.*, 2011).

2.4.2. O GENE *IMPA1*

O gene *IMPA1* codifica a inositol monofostase 1, uma enzima que desfosforila o inositol monofosfatado para gerar o inositol livre. Essa via enzimática é importante para inúmeras funções celulares, pois o fosfatidilinositol (PI) e seus derivados desempenham um papel crucial na sinalização intracelular devido a produção dos segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trifosfato (IP₃) (OHNISHI *et al.*, 2007) (figura 2). O IP₃ liga-se a receptores intracelulares (principalmente no retículo endoplasmático e mitocôndrias) que mediam a abertura de canais de cálcio, levando a um aumento na concentração de Ca⁺⁺ no citoplasma. Esse aumento promove a ativação de vários processos cálcio-dependentes (ativação de proteínas quinases, por exemplo). O próprio cálcio pode funcionar como segundo mensageiro agindo na superfície citoplasmática de alguns canais iônicos, alterando seus estados de abertura. Já o DAG ativa proteínas quinases C que fosforilam uma ampla gama de proteínas estruturais e funcionais (STREB *et al.*, 1983; RUGGIERO *et al.*, 1994).

A inositol monofosfatase 1 ocupa uma posição pivô nos mecanismos homeostáticos do inositol intracelular, pois se localiza na confluência de duas vias distintas para a manutenção dos níveis de inositol: a recuperação via d-mio-inositol-1-fosfato, e pela síntese de novo de inositol a partir da glicose. A única via livre da dependência dessa enzima é a baseada no inositol proveniente do plasma, isto é, via alimentação (figura 2). Portanto, a atividade da *IMPA1* é um passo crítico e limitante da regeneração do ciclo do inositol (RUGGIERO *et al.*, 1994; OHNISHI *et al.*, 2007).

Do ponto de vista clínico, a enzima *IMPA1* tem atraído o interesse de vários pesquisadores há muitos anos. O transtorno bipolar é caracterizado por episódios recorrentes de flutuações do humor entre mania e depressão. O lítio tem sido utilizado há mais de 50 anos como um fármaco de primeira linha no tratamento da bipolaridade (GOODWIN e JAMISON, 1990). Interessantemente, o lítio inibe de forma não competitiva a atividade da *IMPA1* por meio de concentrações terapêuticas (HALLCHER e SHERMAN, 1980). Portanto, vários estudos vêm sugerindo que anormalidades nos mecanismos intracelulares de transdução de sinais, particularmente,

o sistema de segundos mensageiros do ciclo do inositol estejam envolvidos na fisiopatologia desse transtorno (FRIEDMAN *et al.*, 1993; JOPE *et al.*, 1996; HAHN e FRIEDMAN, 1999). Devido à impossibilidade de se examinar esse sistema de segundos mensageiros no cérebro de pacientes vivos, recentemente, as pesquisas na área têm focado em construir modelos animais *impal knockout*, bem como estudar as consequências do uso do lítio em animais (CRYNS *et al.*, 2008; KIMATA *et al.*, 2012; OHNISHI *et al.*, 2013; OHNISHI *et al.*, 2014).

Até o momento, nenhum fenótipo clínico tinha sido associado à mutação no gene *IMPAL* em humanos. O entendimento da via do inositol nos pacientes com deficiência intelectual associada ao *IMPAL*, descritos neste trabalho, pode contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas tanto para esses pacientes quanto para os com transtorno bipolar.

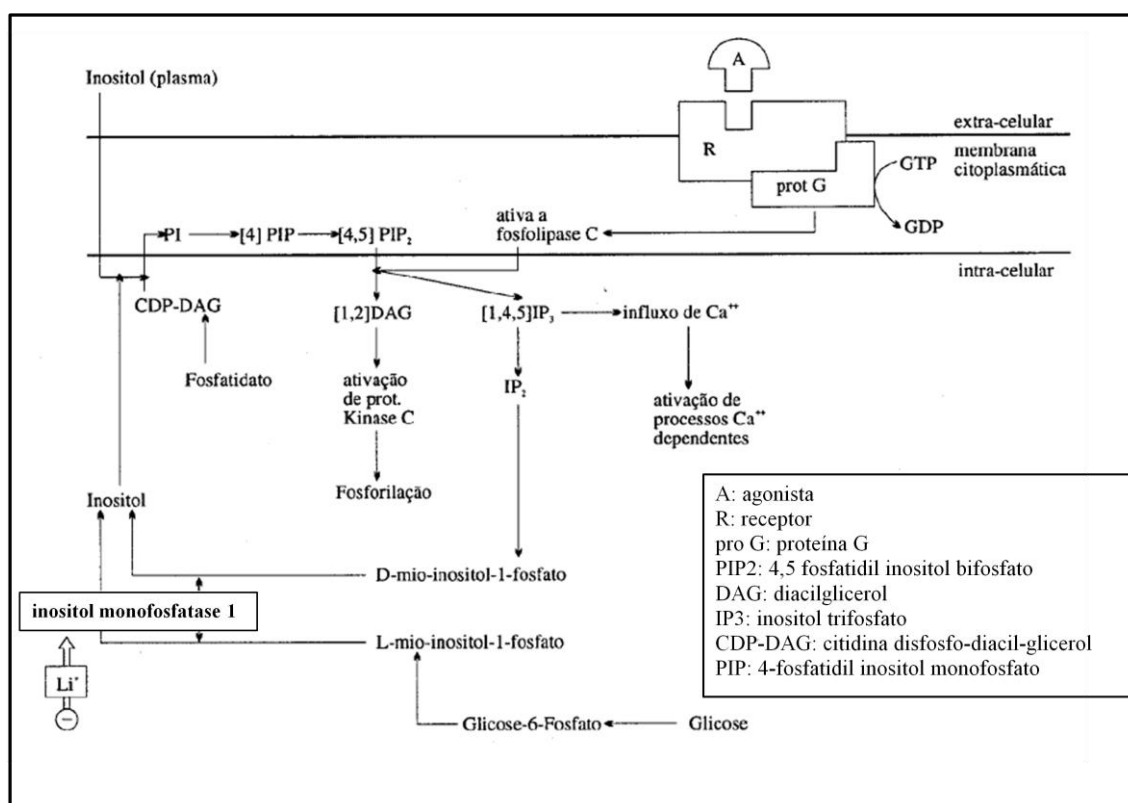


Figura 2. Ciclo do inositol, inibição do lítio e fontes de inositol para a célula. (Fonte: RUGGIERO *et al.*, 1994, ADAPTADO)

2.5. AVANÇOS NOS ESTUDOS GENÉTICOS DA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

O avanço da identificação em larga escala de genes patogênicos devido à introdução de técnicas de sequenciamento de nova geração tornou esse tipo de pesquisa

mais rápida e menos custosa, alavancando a identificação de genes que agem diretamente com outros genes já associados à DI ou que fazem parte de uma mesma via metabólica. Entender as redes de interações entre os genes e proteínas é de fundamental importância para a compreensão da patogênese molecular da DI, bem como, para a utilização e o desenvolvimento de medicamentos terapêuticos (ROPERS, 2010).

O uso das técnicas de sequenciamento de regiões codificadoras (exoma) permitiu a descoberta, em menos de dez anos, de mais de vinte novos genes associados à DI autossômica recessiva (OMIM) e existe a expectativa de que mais de mil genes estejam envolvidos na determinação dessa condição (ROPERS, 2010). Em outra vertente das pesquisas, recentemente, com o uso do sequenciamento do genoma completo, tem sido possível a descoberta de mutações em regiões regulatórias ou não codificantes, bem como a descoberta de microdeleções, duplicações e variações no número de cópias dos genes. Mecanismos que envolvem fatores de transcrição, a grande diversidade de microRNAs e outros elementos regulatórios, bem como as interações epigenéticas, constituem hoje o foco de interesse das pesquisas na área da Genética Médica.

Parece razoável afirmar, portanto, que estamos cada vez mais perto de desvendar as relações entre genótipo e fenótipo no misterioso universo da deficiência intelectual, graças ao incessante avanço na tecnologia de sequenciamento de DNA, as tecnologias para estudos funcionais e a existência de banco de dados mundiais de variantes genéticas de fácil acesso, como no caso do ExAC (*Exome Aggregation Consortium*).

3. HIPÓTESE DE TRABALHO

A estratégia de associar o uso de técnicas de sequenciamento de nova geração ao estudo de famílias consanguíneas com repetições de casos de deficiência intelectual, principalmente no Oriente Médio e da Ásia, tem permitido a elucidação das causas genéticas de vários casos de DIAR e tem evidenciado a heterogeneidade genética dessa condição. Sabemos que dois fatores associados, a consanguinidade e o isolamento geográfico, contribuem para elevar a frequência de doenças genéticas de herança recessiva. Nesta pesquisa, partimos da hipótese de trabalho de que seria possível identificar novos genes associados à DIAR em populações do sertão nordestino porque elas mantiveram a tradição de casamentos consanguíneos, desde a colonização, e permaneceram relativamente isoladas.

A identificação de genes associados à DI permite a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e o estabelecimento de relações entre genótipo e fenótipo. Esse conhecimento é fundamental para o avanço da Ciência em diferentes áreas do conhecimento, tanto nas Ciências Biológicas quanto para as áreas aplicadas da Genética Humana e Médica. A identificação das mutações associadas às doenças favorece a detecção precoce de grupos de riscos facilitando a adoção de medidas preventivas. Além disso, pode prenunciar a eficácia de um dado tratamento medicamentoso proposto (testes prognósticos). Essa última aplicação é referida como farmacogenômica e constitui seguramente um dos grandes benefícios tangíveis proporcionado pelas ferramentas biotecnológicas para a Genética Médica.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a investigação genética de casos de deficiência intelectual em populações consanguíneas do sertão paraibano.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar famílias com repetição de casos de deficiência intelectual em seis municípios do sertão paraibano com elevada taxa de consanguinidade;
- Descrever o quadro clínico das deficiências encontradas;
- Mapear os *loci* gênicos associados às formas de deficiência intelectual;
- Identificar os genes e as mutações associadas às formas de deficiência intelectual;
- Desenvolver testes genéticos que permitam a identificação de indivíduos afetados e portadores das mutações em heterozigose para fins de aconselhamento genético.
- Realizar o aconselhamento genético das famílias participantes da pesquisa.

5. METODOLOGIA COMPLEMENTAR

Os métodos utilizados para cumprir com os objetivos desta tese foram descritos nos artigos apresentados nos resultados. As informações adicionais que não foram tratadas nas publicações serão descritas a seguir.

5.1. PROSPECÇÃO DAS FAMÍLIAS SELECIONADAS PARA ESTUDO

Os métodos utilizados para prospecção de famílias para estudos clínico-genéticos já foram descritos em diferentes publicações (SANTOS *et al.*, 2010; WELLER *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014). A seleção dos municípios para os estudos de genética comunitária foi realizada considerando a maior frequência de uniões consanguíneas; maior porcentagem de indivíduos com deficiência considerando dados do SIAB/DATASUS; municípios vizinhos formando “clusters” e interesse das secretarias de saúde municipais em participar do estudo. A partir disso, selecionamos seis municípios marcados no mapa abaixo (figura 3).

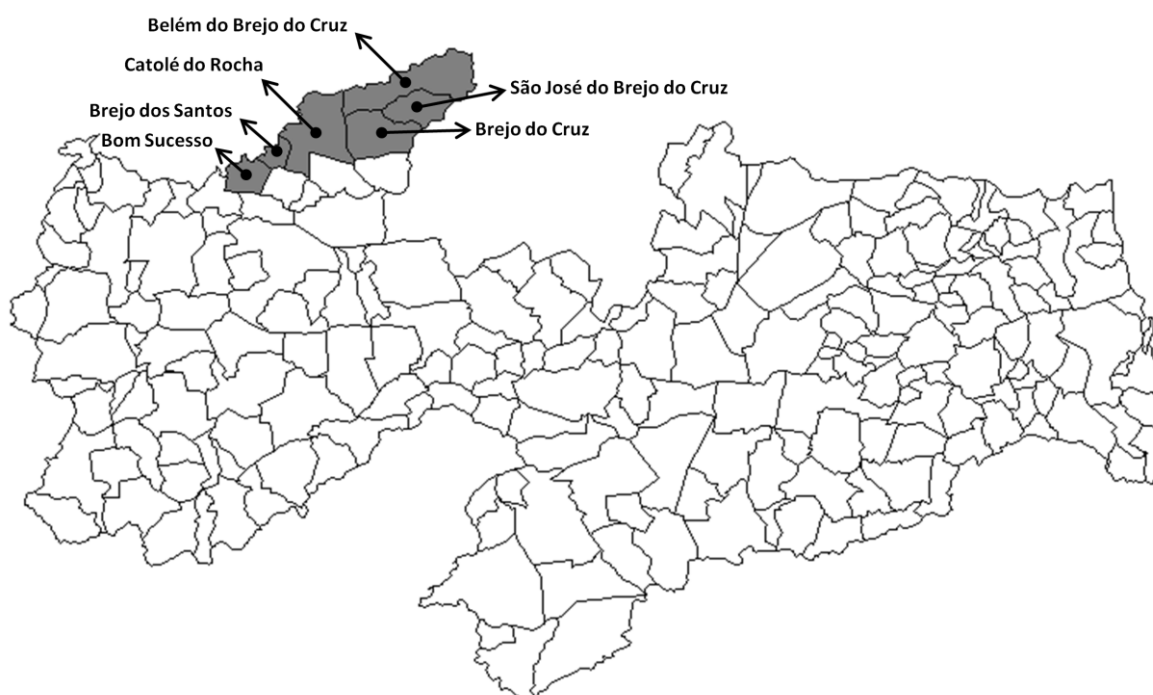


Figura 3. Mapa do estado da Paraíba. Os municípios que participaram do estudo estão em cinza.

Antes de iniciar as ações em campo, os pesquisadores do grupo reuniram-se com os gestores municipais e profissionais do Programa de Saúde da Família (PSF) para

definição de estratégias e cronograma de trabalho. Posteriormente, realizamos seminários para os Agentes Comunitários de Saúde (ACS) para apresentação dos objetivos da pesquisa, a inserção dos mesmos na pesquisa e explicados conceitos de Genética Médica.

As famílias com indivíduos portadores de deficiência foram indicadas pelos ACS, os quais acompanharam os pesquisadores durante as ações em campo. Em vez de entrevistar todos os indivíduos com deficiência, priorizamos as famílias que possuíam mais de dois afetados por uma mesma deficiência, principalmente, deficiências neuromusculares e/ou deficiência intelectual. Os mesmos foram selecionados previamente pelos pesquisadores e convocados pelos ACS para participarem da ação. Inicialmente, realizamos entrevistas com 276 pacientes previamente selecionados. Durante as entrevistas com os biólogos geneticistas, realizadas nos principais postos de saúde dos municípios, foram colhidas informações sobre a história e a evolução dos quadros clínicos, bem como, fizemos os heredogramas dos pacientes. A partir disso, selecionamos 109 pacientes que possuíam deficiência por prováveis causas genéticas, para avaliação médica com três neurologistas da equipe do Dr. Fernando Kok do Hospital das Clínicas de São Paulo que atuam na área de neurogenética e participaram da ação de genética comunitária.

Ao longo da prospecção, foram selecionadas duas famílias com indivíduos acometidos por duas diferentes formas de deficiência intelectual de herança autossômica recessiva para investigação genética.

5.2. ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual da Paraíba, com protocolo de nº 0359.0.133.000-11 (em ANEXO), e encontra-se em concordância com os princípios da Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde, que versa sobre a pesquisa envolvendo seres humanos. As famílias envolvidas neste trabalho receberam explicações verbais e escritas a respeito da pesquisa e, quando concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a declaração de autorização institucional.

5.3. EXTRAÇÃO DE DNA

Foi coletado cerca de 5 ml de sangue periférico para extração de DNA. O DNA foi extraído utilizando o aparelho *Autopure LS* (Gentra Systems, Minneapolis, MN,

EUA) disponível no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, Universidade de São Paulo. Posteriormente, a concentração de DNA de cada amostra foi medida com o auxílio do espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) e uma alíquota foi diluída em água *milli-Q* para obtenção de amostras de DNA com concentração entre 100 e 200ng/ μ L.

5.4. ENSAIO DE MICROARRANJOS DE DNA E CÁLCULO DE LOD SCORES

Para determinar regiões em homozigose e realizar o estudo de ligação foram realizados ensaios de microarranjos de SNP, utilizando a plataforma da *Affymetrix* (Santa Clara, CA, EUA) com os chips *Genome-Wide Human SNP Array 6.0* (que incluem sondas para 906,600 SNP) seguindo as especificações do fabricante. As análises de qualidade do contraste (*contrast QC metric*) e da quantidade de SNP genotipados por paciente (*QC Call Rate metric*) foram realizadas pelo programa *Affymetrix® Genotyping Console™ Software*.

O programa ALOHOMORA foi utilizado para converter os dados de genótipos obtidos da plataforma *Affymetrix* em arquivos adequados para análise de ligação. O programa *Pedcheck* foi usado para verificação de erros de segregação mendeliana (RUSCHENDORF e NURNBERG, 2005). O programa MERLIN (ABECASIS *et al.*, 2002) foi utilizado para a obtenção de *LOD scores* de múltiplos pontos. Os *LOD scores* de múltiplos pontos resultam da análise de segregação de vários marcadores polimórficos de um mesmo segmento cromossômico simultaneamente em relação à doença. Os *LOD scores* foram calculados utilizando-se frequência gênica do alelo mutado de 0,0001.

5.5. TRIAGEM DA MUTAÇÃO NO GENE *IMPA1* POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO

A mutação c.489_483dupGGGCT no gene *IMPA1*, identificada a partir do sequenciamento do exoma de um paciente (metodologia descrita no artigo 2), criou um sítio de restrição para a enzima *BseYI*.

Para obter os padrões de bandas acima, inicialmente foi realizada a amplificação da região gênica envolvendo a mutação por meio da técnica de PCR, utilizando os *primers forward*: 5'-CCATGAACAGGAATGCAAAA -3' e *reverse*: 5'-GGGATACAAATGCCCTCTTC -3', gerando um amplicon de 193 pares de base. Os reagentes utilizados para amplificação de cada amostra foram: 0,7 μ l de MgCl₂ (50

mM), 2,5 µl de Tampão PCR 10X, 2,5 µl de dNTP's (2,5 mM), 0,5 µl de cada *primer* (50 pmol), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl), 50ng de DNA e completa com água *miliQ* para o volume final de 25 µl. Foi utilizada a PCR *touchdown* com temperatura inicial de anelamento de 62°C (-0,5°C/ciclo) no termociclador DNA Engyne Dyad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os produtos obtidos pela amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,5%. Após confirmação da amplificação via PCR do DNA genômico, cada produto foi submetido à digestão com a endonuclease de restrição *BseYI*, permanecendo a 37°C por 1 hora e 80°C por 20 minutos, conforme especificação do fabricante New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA). A reação de digestão foi realizada nas seguintes condições: 2,0 µl de NEBuffer (10X), 5U (1µl) da enzima, 4 µl de produtos de PCR e completa com água *miliQ* para o volume final de 20 µl. Os fragmentos obtidos após a digestão foram corridos em gel poliacrilamida (10%) em 80V por duas horas e fotografado utilizando o fotodocumentador ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Biociences, Piscataway, NJ, EUA).

6. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados no formato de artigos científicos. O artigo 1 foi publicado no periódico *Journal of Medical Genetics* e intitulado “**Homozygous missense mutation in MED25 segregates with syndromic intellectual disability in a large consanguineous family**” e o artigo 2 publicado no periódico *Molecular Psychiatry* e intitulado “**A homozygous loss-of-function mutation in inositol monophosphatase 1 (IMPA1) causes severe intellectual disability**”.

ARTIGO 1

ORIGINAL ARTICLE

Homozygous missense mutation in *MED25* segregates with syndromic intellectual disability in a large consanguineous family

Thalita Figueiredo,^{1,2} Uirá Souto Melo,³ André Luiz Santos Pessoa,^{4,5} Paulo Ribeiro Nobrega,⁴ João Paulo Kitajima,⁶ Igor Correa,⁶ Mayana Zatz,³ Fernando Kok,^{3,4} Silvana Santos^{1,2}

¹Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Paraíba (UFPB), Joao Pessoa, PB, Brazil

²Department of Biology, Paraíba State University (UEPB), Campina Grande, PB, Brazil

³Human Genome and Stem Cell Research Center, Biosciences Institute, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, SP, Brazil

⁴Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, SP, Brazil

⁵Fortaleza University (UNIFOR), Fortaleza, CE, Brazil

⁶Mendelics Genomic Analysis, Sao Paulo, SP, Brazil

Correspondence to

Professor Silvana Santos, Department of Biology, Paraíba State University, Rua das Baraúnas, 351, Bodocongó, Campina Grande, Paraíba 58.410-367, Brazil; silvanasantos@ccbs.uepb.edu.br

Received 24 September 2014

Revised 25 November 2014

Accepted 26 November 2014

Published Online First

19 December 2014



CrossMark

To cite: Figueiredo T, Melo US, Pessoa ALS, et al. *J Med Genet* 2015;**52**: 123–127.

ABSTRACT

Background Intellectual disability (ID) is a highly heterogeneous condition affecting 2% of the population worldwide. In a field study conducted in a highly inbred area of Northeastern Brazil, we investigated a consanguineous family in which seven adults presented syndromic ID.

Methods Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix) microarray was used to determine regions of homozygosity-by-descent and whole exome sequencing (WES) was performed in one affected individual using Extended Nextera Rapid-Capture Exome and Illumina HiSeq2500.

Results We found two regions with an logarithm of the odds (LOD) score of 3.234: a region spanning 4.0 Mb in 19q13.32-q13.33 and a pericentromeric 20 Mb area in chromosome 2 (2p12-q11.2). WES disclosed in the critical region of chromosome 19 a homozygous variant (c.418C>T, p.Arg140Trp) in Mediator complex subunit 25 (*MED25*), predicted as deleterious by PolyPhen-2, Provean, Mutation Taster and Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT). *MED25* is a component of the Mediator complex, involved in regulation of transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Deleterious mutations in *MED12*, *MED17* and *MED23* have already been associated with ID.

Conclusions These findings demonstrate that the combination of field investigation of families in highly inbred regions with modern technologies is an effective way for identifying new genes associated with ID.

INTRODUCTION

Intellectual disability (ID) is a highly heterogeneous condition affecting 2% of the population worldwide. It is the most common motive for referral to clinical genetic centres and one of the most important unsolved problems in healthcare.^{1,2} The genetic basis of autosomal recessive ID (ARID) is extremely heterogeneous and the number of underlying gene defects may well go beyond a thousand.³ Currently, fewer than 100 loci and genes have been identified associated with ARID (OMIM), which is particularly prevalent in highly consanguineous populations and genetic isolates.^{4,5} In Brazil, the frequency of consanguineous marriages is about 15 times higher in the Northeast region (9%) than in the Southern part of the country (0.62%).^{6–8} A study

conducted in small communities in Northeastern Brazil identified rates of consanguineous unions ranging from 6% to 41.1%.⁹ As part of a research project on consanguinity and disability aiming the identification of new disease genes, which is being performed in the backlands of Northeastern Brazil, we ascertained several families with multiple individuals with disabilities and selected some of them for additional investigation. Subjects of the current investigation belonged to a large inbred family in which three consanguineous unions generated seven individuals with moderate to severe ID associated with a distinct facial phenotype.

METHODS

Clinical analysis and family material

After obtaining a written consent from the legal guardians of subjects of this study, a detailed clinical and neurological evaluation was performed. A pedigree was constructed based on the family information (figure 1) and blood samples from affected and unaffected family members were collected for DNA extraction (Autopure LS device, Gentra Systems). The protocol of data sampling and the consent procedure were reviewed and approved by the National Committee for Ethics in Research—CONEP (Process 0359.0.133.000-11).

Linkage study

Linkage study was performed using DNA samples from three affected (V-8, V-12 and V-13) and three healthy individuals (IV-4, V-6 and V-10) from the same family. Genotyping was done with the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, California, USA), and the data were analysed using HomozygosityMapper for homozygosity mapping.¹⁰ The Alohomora software was used to convert the obtained data into files for linkage analysis, Pedcheck for checking Mendelian segregation and Merlin software to obtain multi-point LOD scores.^{11,12} The disease was analysed as an autosomal recessive mode of inheritance with complete penetrance and the disease allele frequency was estimated as 0.001.

Exome and Sanger sequencing

Whole exome sequencing (WES) was performed in a DNA sample from one affected individual (V-12) using Extended Nextera Rapid-Capture Exome and

New loci

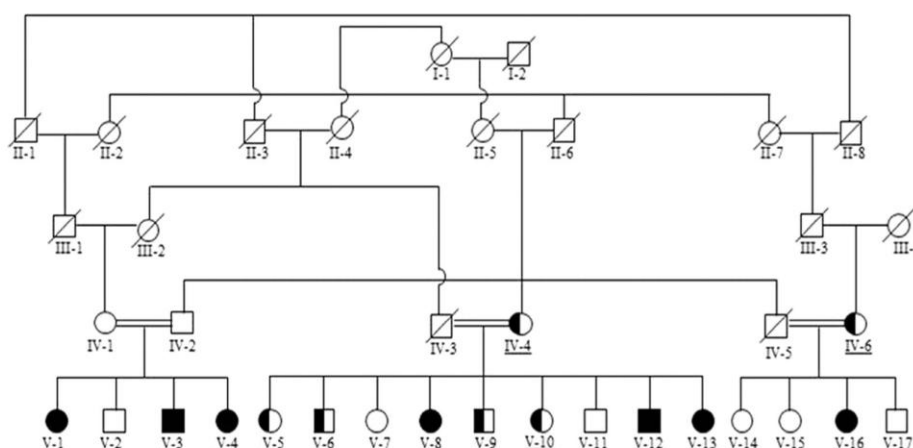


Figure 1 Family pedigree: individuals with intellectual disability are represented in filled symbols and half-filled symbols indicate heterozygous individuals. Genotyped individuals are underlined.

sequenced in Illumina HiSeq2500 (Illumina, San Diego, California, USA). Exome reads were analysed in a standard Bioinformatics pipeline based on Burrows-Wheeler Aligner (BWA) for sequence alignment on GRCh37 reference, Broad Institute GATK for genotyping, SnpEff for variant annotation and ExomeDepth for CNV detection.^{13–16} Potentially deleterious variants detected in regions of homozygosity-by-descent and not present in 61 486 exomes from the Exome Aggregation Consortium (ExAC) and in Brazilian population controls (608 healthy individuals) were selected for further scrutiny and segregation analysis by Sanger sequencing. PCR products were amplified using the following primers: forward: 5'-GGCGTTGC TTCTGATTCAT-3'; reverse: 5'-GAGTCCTCACCTCCCCAA TC-3'; and the reaction products were analysed in the ABI 3730 DNA Analyzer equipment (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). The results were analysed using the Sequencher 5.0 and MEGA 5.

RESULTS

We evaluated seven individuals (two men, ages 33–51) belonging to three related consanguineous families. Variable degree of ID was present in all seven individuals: moderate in two (V-3 and V-4) and severe in the remaining five. They all are illiterate and never attended regular school. One individual (V-3) was able to work supervised, and the severe patients were totally dependent for basic care and able to speak a few words and most of the time utter incomprehensible sounds and need constant vigilance. Behaviour problems, as aggressiveness and sexual arousal, were occasionally present. The facial characteristics were very similar in all affected individuals: tall forehead, prognatism, prominent chin, very large and overhanging nose tip (figure 2). This facial phenotype was not present among parents and the five clinically evaluated unaffected siblings. The legal guardians of patients have provided consent for publication of these photographs.



Figure 2 Facial features of affected individuals: tall forehead, prognatism, prominent chin and very large and overhanging nose tip. (A, B) V-1 age 43 years; (C, D) V-3 age 37 years; (E, F) V-4 age 33 years; (G, H) V-8 age 51 years; (I, J) V-12 age 43 years; (K, L) V-13 age 38 years; (M, N) V-16 age 42 years.

Autozygosity mapping and parametric linkage analysis led to the identification of two linkage regions which get the same maximum LOD score of 3.234 on chr19: 47 658 320–51 657 650 (19q13.32–q13.33) and on chr2: 76 245 774–102 080 926 (2p12–q11.2). Sequences of 167 genes are located on candidate region of chromosome 2 and 214 genes on candidate region of chromosome 19. Those regions are devoid of genes associated with ARID, with the exception of the recently described autosomal recessive mental retardation-41 (MRT41; OMIM 615637), caused by truncating homozygous mutation on *KPTN* gene, located on chromosome 19.¹⁷ MRT41 was recognised in four individuals with non-syndromic ARID from consanguineous Amish families.

The coverage of WES with at least 10 reads was 99.18%, every base was independently read on average 158 times and a total of 95 313 806 sequences were generated. We selected for further evaluation homozygous coding variants present in a consensus coding transcript not present in controls. The only remaining coding variant in the linkage regions which fulfil these criteria of possible disease-causing variant was the missense change c.418C>T (p.Arg140Trp; chr19:50 332 240; NM_030973) in *MED25* gene (OMIM 610197) (figure 3). It encodes one of the subunits from Mediator's tail region that are required for regulating expression of most RNA polymerase II (polII) transcripts.¹⁸ This variant cosegregated with the disease and was not present in Brazilian population controls (608 healthy individuals) as well as in 61 486 exomes from the ExAC (Cambridge, Massachusetts, USA; <http://exac.broadinstitute.org>) (18 November 2014 accessed date). Moreover, p.R140W is conserved across *MED25* orthologues and predicted as deleterious by PolyPhen-2, Provean, Mutation Taster and SIFT.^{19–22}

DISCUSSION

ID is a highly heterogeneous disorder, and identification of autosomal genes associated with this condition, in particular in families with few affected members, only recently became more feasible, mostly because of more efficient technologies for linkage analysis and identification of the responsible gene. On the other hand, the search for large consanguineous families with multiple affected individuals once more proved to be an effective way for identifying new genetically determined

autosomal recessive forms of ID. Indeed, the number of X linked ID associated genes currently surpasses the frequency of ARID related genes, because most studies of the genetic causes of ID were concentrated on X-chromosome-linked ID. However, it is estimated that X linked forms represents only 10% of ID, which suggests that a large number of autosomal genes associated with ID remain to be recognised.^{4 23}

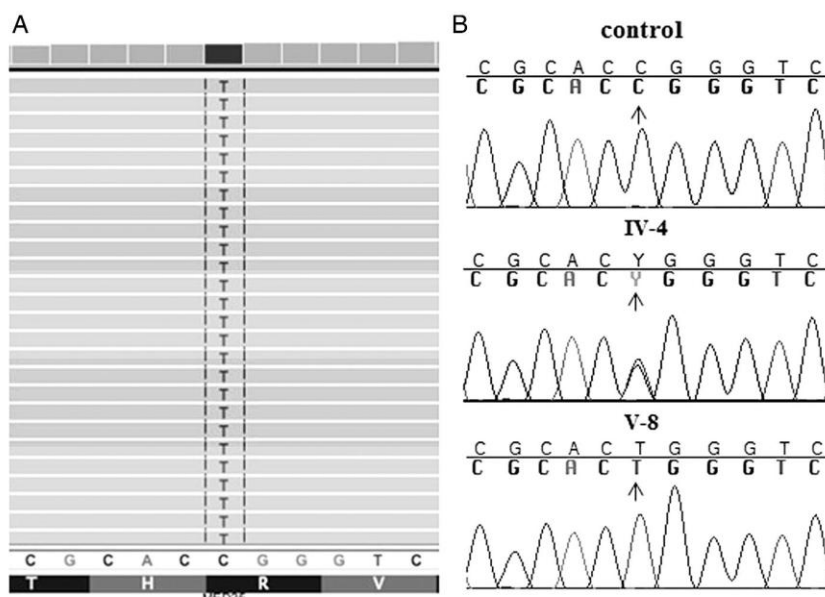
The Mediator complex (MED) is a multi-protein complex composed of more than 20 subunits that form four distinct modules evolutionarily conserved in eukaryotes required for regulating expression of most RNA polII transcripts, which include protein-coding and most non-coding RNA genes, performing its function by interacting directly with RNA Pol II activators bound at regulatory elements and also elongation factors of target genes.^{18 24 25} Several studies using experimental models (*Danio rerio*, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* and mouse models) indicated that some components of the MED may interact with specific transcription factors, thus regulating the expression of distinct groups of genes during development and/or cell differentiation.²⁶

In recent years, functional studies showed the importance of *MED25* in the activation of transcription by several transcription factors, including the retinoic acid receptor (RAR α),²⁷ orphan receptor (HNF4 α),²⁸ chondrogenic factor (Sox9),²⁹ PEA3 group members,³⁰ activating transcription factor 6 (ATF6 α)³¹ and estrogen receptor α .³² These factors are involved in different developmental processes and they control multiple metabolic pathways,^{28 32} development of motor and sensory neurons,³³ response of human cells to endoplasmic reticulum stress, which are critical for cell survival and defects can cause neurodegeneration³⁴ and chondrogenesis.²⁹

Morpholino-mediated knockdown of *med25* induced palatal malformation in zebrafish, which is comparable with that observed in zebrafish *sox9* mutants.²⁹ Furthermore, expression analysis of *MED25* in wild-type rats tissues detected ubiquitous expression and highest expression levels were found in dorsal root ganglia, cerebellum, cortex and optic nerve indicating an important involvement of *MED25* in the nervous system.³⁵

A single report of a large family associates the homozygous variant p.Ala335Val in *MED25* with Charcot–Marie–Tooth

Figure 3 Mutation in *MED25*: (A) Whole exome sequencing (WES) image of the *MED25* BAM file base counts, highlighting the c.418C>T variant. (B) Sanger sequencing electropherograms showing homozygous control (arrow), heterozygous (arrow) at position c.418 of *MED25* gene in a carrier (III-2) and homozygosity (arrow) in an affected individual (IV-1).



New loci

disease type 2B2 (CMT2B2, OMIM #605589).³⁵ The variant attributed to CMT2 on MED25 (c.1004C>T) has a population frequency among Europeans (non-Finnish) of 1/160 (0.006042), which is quite large for a rare disease. Additionally, no other family with CMT2B2 was reported since the original publication of 2009 and no other gene belonging to MED was associated with CMT. Additionally, no other gene coding for proteins belonging to MED was ever associated with CMT. Finally, since there is no evidence for CMT-like features in the presented Brazilian family, it appears that the p.Ala335Val variant identified in CMT2B2 patients might be a rare benign variant rather than the causative mutation. Mutations in other members of MED have been already assigned to other syndromes. Deleterious missense variants in *MED12* have been previously associated with Ohdo, Lujan and Opitz–Kaveggia syndromes, all X linked syndromic forms of ID.^{36–38} A homozygous missense mutation (p.L371P) in *MED17* has been associated with syndromic severe ID with infantile cerebral and cerebellar atrophy.³⁹ Finally, a homozygous disease-causing coding variant (p.R617Q) within the *MED23* gene was identified in an Algerian consanguineous family with five affected individuals with non-syndromic ID. This mutation modified the response of *JUN* and *FOS* immediate early genes to serum mitogens by altering the interaction between enhancer-bound transcription factors and Mediator. Dysregulation of these genes have been also observed in cells from patients with other neurological disorders, including Opitz–Kaveggia, caused by *MED12* mutation.⁴⁰

These findings emphasise the critical role of Mediator in brain functioning and development and highlight the importance of a combined strategy of field evaluation in remote areas in which large inbred families are common and state-of-art technologies for identification of novel deleterious variants in genes currently not associated with a distinct phenotype.

Acknowledgements This investigation would not have been possible without the contribution of many Health Agents from the Program of Family Health of several municipalities of the backlands of Paraíba State, Brazil. We are also grateful for the support of local authorities and for the unrestricted support and enthusiasm of the families involved in this study. This manuscript is dedicated to them, who with all adversity never lost their hope.

Contributors TF: field evaluation of families, linkage analysis, family genotyping, manuscript concept. USM: family genotyping, manuscript revision. ALSP and PRN: clinical evaluation. JPK: NGS bioinformatics and exome data analysis. IC: NGS bioinformatics. MZ: manuscript concept and revision. FK: clinical evaluation, exome data analysis, manuscript concept and revision. SS: health agents training, patients field evaluation, manuscript concept and revision.

Funding This study was financially supported by the UEPB/PROPESQ, FAPESQ/CNPq/PPSUS, CAPES, CNPq/INCT and FAPESP/CEPID.

Competing interests None.

Ethics approval National Committee for Ethics in Research—CONEP (Process 0359.0.133.000-11).

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Afroze B, Chaudhry B. Genetics of non-syndromic autosomal recessive mental retardation. *J Pak Med Assoc* 2013;63:106–10.
- Kuss AW, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Behjati F, Darvish H, Abbasi-Moheb L, Puettmann L, Zecha A, Weissmann R, Hu H, Mohseni M, Abedini SS, Rajab A, Hertzberg C, Wieczorek D, Ullmann R, Ghasemi-Firouzabadi S, Banihashemi S, Arzhanghi S, Hadavi V, Bahrami-Monajemi G, Kasiri M, Falah M, Nikuei P, Dehghan A, Sobhani M, Jamali P, Ropers HH, Najmabadi H. Autosomal recessive mental retardation: homozygosity mapping identifies 27 single linkage intervals, at least 14 novel loci and several mutation hotspots. *Hum Genet* 2011;129:141–8.
- Garshasbi M, Kahrizi K, Hosseini M, Nouri Vahid L, Falah M, Hemmati S, Hu H, Tzschach A, Ropers HH, Najmabadi H, Kuss AW. A novel nonsense mutation in *TUSC3* is responsible for non-syndromic autosomal recessive mental retardation in a consanguineous Iranian family. *Am J Med Genet* 2011;155A:1976–80.
- Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P, Zecha A, Mohseni M, Puettmann L, Vahid LN, Jensen C, Moheb LA, Bienek M, Lari F, Mueller I, Weissmann R, Darvish H, Wrogemann K, Hadavi V, Lipkowitz B, Esmaeili-Nieh S, Wieczorek D, Kariminejad R, Firouzabadi SG, Cohen M, Fattahi Z, Rost I, Mojahedi F, Hertzberg C, Dehghan A, Rajab A, Banavandi MJ, Hoffer J, Falah M, Musante L, Kalscheuer V, Ullmann R, Kuss AW, Tzschach A, Kahrizi K, Ropers HH. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 2011;478:57–63.
- Rafiq MA, Ansar M, Marshall CR, Noor A, Shaheen N, Mowjoodi A, Khan MA, Ali G, Amin-ud-Din M, Feuk L, Vincent JB, Scherer SW. Mapping of three novel loci for non-syndromic autosomal recessive mental retardation (NS-ARMR) in consanguineous families from Pakistan. *Clin Genet* 2010;78:478–83.
- Freire-Maia N. Inbreeding in Brazil. *Am J Hum Genet* 1957;9:284–98.
- Freire-Maia N. Genetic effects in Brazilian populations due to consanguineous marriages. *Am J Med Genet* 1989;35:115–17.
- Fonseca LG, Freire-Maia N. Further data on inbreeding levels in Brazilian populations. *Social Biol* 1970;17:324–8.
- Weller M, Taniere M, Pereira JC, Almeida ES, Kok F, Santos S. Consanguineous Unions and the Burden of Disability: a population-based study in communities of Northeastern Brazil. *Am J Hum Biol* 2012;6:835–40.
- Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nürnberg P. HomozygosityMapper—an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res* 2009;37:593–9.
- Ruschendorf F, Nürnberg P. ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10k SNP array data. *Bioinformatics* 2005;12:2123–5.
- Abecasis G, Cherny S, Cookson W, Cardon L. Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 2002;30:97–101.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2010;26:589–95.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010;20:1297–303.
- Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 2012;6:80–92.
- Plagnol V, Curtis J, Epstein M, Mok KY, Stebbings E, Grigoriadou S, Wood NW, Hambleton S, Burns SO, Thrasher AJ, Kumararatne D, Doffinger R, Nejentsev S. A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics* 2012;28:2747–54.
- Baple EL, Maroofian R, Chioza BA, Izadi M, Cross HE, Al-Turki S, Barwick K, Skrzypiec A, Pawlak R, Wagner K, Coblenz R, Zainy T, Patton MA, Mansour S, Rich P, Qualmann B, Hurler ME, Kessels MM, Crosby AH, Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. Mutations in *KPTN* cause macrocephaly, neurodevelopmental delay, and seizures. *Am J Hum Genet* 2014;94:87–94.
- Malik S, Roeder RG. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* 2005;30:256–63.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248–9.
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* 2012;7:e46688.
- Schwarz JM, Roedelsperger C, Schuelke M, Seelow D. Mutation Taster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 2010;7:575–6.
- Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3812–14.
- Ropers HH. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2010;11:161–87.
- Collins SR, Miller KM, Maas NL, Roguev A, Fillingham J, Chu CS, Schuldiner M, Gebbia M, Recht J, Shales M, Ding H, Xu H, Han J, Ingvarsdottir K, Cheng B, Andrews B, Boone C, Berger SL, Hieter P, Zhang Z, Brown GW, Ingles CJ, Emili A, Allis CD, Toczyski DP, Weissman JS, Greenblatt JF, Krogan NJ. Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* 2007;446:806–10.
- Tsai KL, Tomomori-Sato C, Sato S, Conaway RC, Conaway JW, Austrias FJ. Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional mediator complex. *Cell* 2014;157:1430–44.
- Napoli C, Sessa M, Infante T, Casamamissi A. Unraveling framework of the ancestral Mediator complex in human diseases. *Biochimie* 2012;94:579–87.
- Lee HK, Park UH, Kim EJ, Um SJ. MED25 is distinct from TRAP220/MED1 in cooperating with CBP for retinoid receptor activation. *EMBO J* 2007;26:3545–57.
- Rana R, Surapureddi S, Kam W, Ferguson S, Goldstein JA. Med25 is required for RNA polymerase II recruitment to specific promoters, thus regulating xenobiotic and lipid metabolism in human liver. *Mol Cell Biol* 2011;31:466–81.
- Nakamura Y, Yamamoto K, He X, Otsuki B, Kim Y, Muroa H, Soeda T, Tsumaki N, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, Crombrughe Bd, Postlethwait JH, Warman ML,

- Nakamura T, Akiyama H. Wwp2 is essential for palatogenesis mediated by the interaction between Sox9 and mediator subunit 25. *Nat Commun* 2011;2:251.
- 30 Verger A, Baert JL, Verreman K, Dewitte F, Ferreira E, Lens Z, de Launoit Y, Villeret V, Monté D. The Mediator complex subunit MED25 is targeted by the N-terminal transactivation domain of the PEA3 group members. *Nucleic Acids Res* 2013;41:4847–59.
- 31 Sela D, Conkright JJ, Chen L, Gilmore J, Washburn MP, Florens L, Conaway RC, Conaway JW. Role for human mediator subunit MED25 in recruitment of mediator to promoters by endoplasmic reticulum stress-responsive transcription factor ATF6 α . *J Biol Chem* 2013;288:26179–87.
- 32 Shi Z, Yang W, Goldstein JA, Zhang SY. Med25 is required for estrogen receptor alpha (ER α)-mediated regulation of human CYP2C9 expression. *Biochem Pharmacol* 2014;90:425–31.
- 33 Arber S, Ladle DR, Lin JH, Frank E, Jessell TM. ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell* 2000;101:485–98.
- 34 Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 2012;197:857–67.
- 35 Leal A, Huehne K, Bauer F, Sticht H, Berger P, Suter U, Morera B, Del Valle G, Lupski JR, Ekici A, Pasutto F, Endeles S, Barrantes R, Berghoff C, Berghoff M, Neundörfer B, Heuss D, Dorn T, Young P, Santolin L, Uhlmann T, Meisterernst M, Sereda MW, Stassart RM, Meyer zu Horste G, Nave KA, Reis A, Rautenstrauss B. Identification of the variant Ala335Val of MED25 as responsible for CMT2B2: molecular data, functional studies of the SH3 recognition motif and correlation between wild-type MED25 and PMP22 RNA levels in CMT1A animal models. *Neurogenetics* 2009;10:275–87.
- 36 Risheg H, Graham JM Jr, Clark RD, Rogers RC, Opitz JM, Moeschler JB, Peiffer AP, May M, Joseph SM, Jones JR, Stevenson RE, Schwartz CE, Friez MJ. A recurrent mutation in MED12 leading to R961W causes Opitz-Kaveggia syndrome. *Nature Genet* 2007;39:451–3.
- 37 Schwartz CE, Tarpey PS, Lubs HA, Verloes A, May MM, Risheg H, Friez MJ, Futreal PA, Edkins S, Teague J, Briault S, Skinner C, Bauer-Carlin A, Simensen RJ, Joseph SM, Jones JR, Gecz J, Stratton MR, Raymond FL, Stevenson RE. The original Lujan syndrome family has a novel missense mutation (p.N1007S) in the MED12 gene. *J Med Genet* 2007;44:472–7.
- 38 Vulto-van Silfhout AT, de Vries BB, van Bon BW, Hoischen A, Ruitkamp-Versteeg M, Gilissen C, Gao F, van Zwam M, Harteveld CL, van Essen AJ, Hamel BC, Kleefstra T, Willemsen MA, Yntema HG, van Bokhoven H, Brunner HG, Boyer TG, de Brouwer AP. Mutations in MED12 cause X-linked Ohdo syndrome. *Am J Med Genet* 2013;92:401–6.
- 39 Kaufmann R, Straussberg R, Mandel H, Fattal-Valevski A, Ben-Zeev B, Naamati A, Shaag A, Zenvirt S, Konen O, Mimouni-Bloch A, Dobyns WB, Edvardson S, Pines O, Elpeleg O. Infantile cerebral and cerebellar atrophy is associated with a mutation in the MED17 subunit of the transcription preinitiation mediator complex. *Am J Hum Genet* 2010;87:667–70.
- 40 Hashimoto S, Boissel S, Zarhrate M, Rio M, Munnich A, Egly JM, Colleaux L. MED23 mutation links intellectual disability to dysregulation of immediate early gene expression. *Science* 2011;333:1161–3.

ARTIGO 2



ORIGINAL ARTICLE

A homozygous loss-of-function mutation in inositol monophosphatase 1 (*IMPA1*) causes severe intellectual disability

T Figueiredo^{1,2,3}, US Melo³, ALS Pessoa^{4,5}, PR Nobrega⁴, JP Kitajima⁶, H Rusch⁷, F Vaz⁷, LT Lucato⁸, M Zatz³, F Kok^{3,4,6} and S Santos^{1,2}

The genetic basis of intellectual disability (ID) is extremely heterogeneous and relatively little is known about the role of autosomal recessive traits. In a field study performed in a highly inbred area of Northeastern Brazil, we identified and investigated a large consanguineous family with nine adult members affected by severe ID associated with disruptive behavior. The Genome-Wide Human SNP Array 6.0 microarray was used to determine regions of homozygosity by descent from three affected and one normal family member. Whole-exome sequencing (WES) was performed in one affected patient using the Nextera Rapid-Capture Exome kit and Illumina HiSeq2500 system to identify the causative mutation. Potentially deleterious variants detected in regions of homozygosity by descent and not present in either 59 723 unrelated individuals from the Exome Aggregation Consortium (Browser) or 1484 Brazilians were subject to further scrutiny and segregation analysis by Sanger sequencing. Homozygosity-by-descent analysis disclosed a 20.7-Mb candidate region at 8q12.3-q21.2 (lod score: 3.11). WES identified a homozygous deleterious variant in inositol monophosphatase 1 (*IMPA1*) (NM_005536), consisting of a 5-bp duplication (c.489_493dupGGGCT; chr8: 82,583,247; GRCh37/hg19) leading to a frameshift and a premature stop codon (p.Ser165Trpfs*10) that cosegregated with the disease in 26 genotyped family members. The *IMPA1* gene product is responsible for the final step of biotransformation of inositol triphosphate and diacylglycerol, two second messengers. Despite its many physiological functions, no clinical phenotype has been assigned to this gene dysfunction to date. Additionally, *IMPA1* is the main target of lithium, a drug that is at the forefront of treatment for bipolar disorder.

Molecular Psychiatry advance online publication, 29 September 2015; doi:10.1038/mp.2015.150

INTRODUCTION

Intellectual disability (ID) is a serious neurodevelopmental disorder that is characterized by an intelligence quotient (IQ) of 70 or below, and deficiency in at least two characteristics essential for adaptive functioning, such as communication, reading, writing and self-care. This condition can usually be diagnosed before the age of 18,¹ and its prevalence is between 1 and 3%.² Though it can be caused by environmental insults such as infection or teratogens, with a high proportion being the result of genetic abnormalities, close to 60% of cases of ID do not have a known etiology.^{3,4}

Recently, exome enrichment and next-generation sequencing have been introduced as cost-effective and fast strategies for disease-gene identification. Using this modern technology, we identified a disease-causing mutation (c.489_493dupGGGCT) within the *IMPA1* gene in a large consanguineous Brazilian family in which nine affected individuals had severe ID and disruptive paranoid behavior.

Inositol monophosphatase 1 (*IMPA1*; EC 3.1.3.25) is the critical enzyme for the recovery of the inositol cycle, and it is key for both

the *de novo* synthesis of inositol and the recycling of inositol polyphosphates generated upon receptor activation.⁵ The inositol phosphate metabolism pathway is involved in normal physiological conditions, such as insulin and PI3K/Akt signaling, endocytosis, vesicle trafficking, exocytosis, cell migration, proliferation, apoptosis, neurotransmitter release, hormone secretion, histamine release in allergic responses and in maintaining the state of homeostasis for second messengers. Thus, dysfunctions of the inositol cycle have been implicated in a variety of human diseases, including developmental defects, cancer, diabetes and neurological diseases.⁶ *IMPA1* has attracted much interest in the genetic studies of neuropsychiatric diseases because in therapeutic concentrations, lithium, the main pharmacological treatment for bipolar disorder, it is an uncompetitive inhibitor of *IMPA1*.^{7,8} Therefore, *myo*-inositol is thought to have an important role in the mechanism of bipolar disorder, and has been the focus of many studies.

Although animal models and *in vitro* analysis have contributed to the understanding of the pathophysiology of *IMPA1* deficiency, no human disease has been attributed to a malfunction of this protein.

¹Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Paraíba (UFPB), Joao Pessoa, Brazil; ²Department of Biology, Paraíba State University (UEPB), Campina Grande, Brazil; ³Department of Genetics and Evolutionary Biology, Human Genome and Stem Cell Research Center, Biosciences Institute, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, Brazil; ⁴Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, Brazil; ⁵School of Medicine, Fortaleza University (UNIFOR), Fortaleza, Brazil; ⁶Mendelics Genomic Analysis, Sao Paulo, Brazil; ⁷Laboratory of Genetic Metabolic Diseases, Department of Clinical Chemistry, University of Amsterdam, Academic Medical Center (AMC), Amsterdam, The Netherlands and ⁸Institute of Radiology, School of Medicine, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, Brazil. Correspondence: Professor F Kok, Department of Neurology, School of Medicine, University of Sao Paulo (USP), Rua Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 255/S 5040, Sao Paulo CEP 05403-010, Brazil. E-mail: fernando.kok@mendelics.com.br

Received 5 May 2015; revised 17 August 2015; accepted 19 August 2015

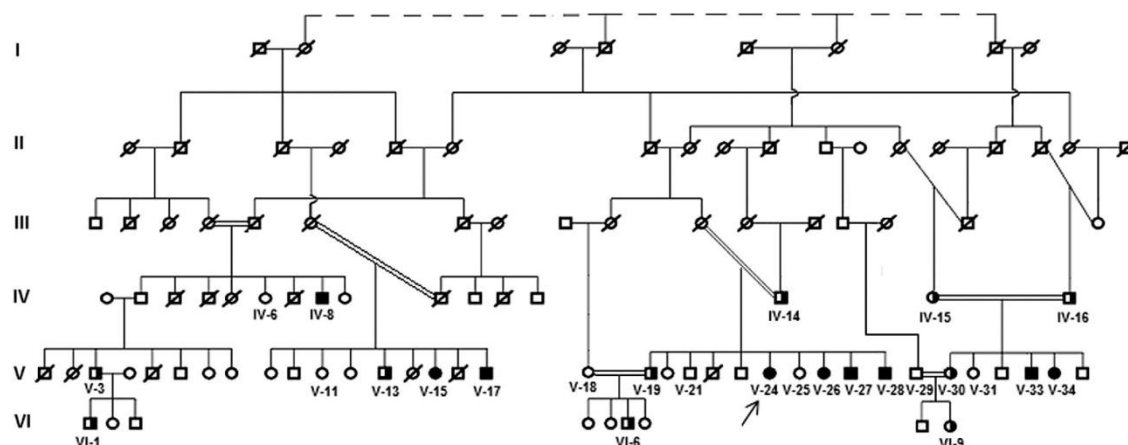


Figure 1. The six generation family pedigree with six consanguineous marriages. DNA was sampled from persons with a code, individuals with intellectual disability are represented by filled symbols and half-filled symbols indicate heterozygous individuals.

MATERIALS AND METHODS

Family ascertainment, genetic and clinical analysis

Affected individuals belonging to a small isolated community in an impoverished area of Northeastern Brazil were clinically evaluated in their hometown, as part of a larger project on prospection of neurologic disorders in highly inbred areas of the country. After obtaining written consent from the parents or legal guardians, blood and urine samples were collected from affected and healthy family members, and a pedigree was constructed on the basis of family information (Figure 1). The data sampling protocol and consent procedure were reviewed and approved by the National Committee for Ethics in Research (CONEP; http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/index.html; Brazil).

Linkage study

Linkage study was performed using DNA samples from three affected individuals (V-24, V-26 and V-27) and one healthy member (V-21) of the same family. Genotyping was performed with the Genome-wide human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) and genome-wide homozygosity analysis was performed by Homozygosity Mapper.⁹ ALOHOMORA¹⁰ software was used to convert the obtained data from the Affymetrix genotype platform into files for linkage analysis, and Pedcheck was used to identify Mendelian inconsistencies. Multipoint linkage analysis using MERLIN¹¹ software was performed assuming a fully penetrant autosomal recessive mode of inheritance with a disease allele frequency of 0.001.

Exome and Sanger sequencing

Whole-exome sequencing (WES) was performed on a DNA sample from one patient (V-24) using the Extended Nextera Rapid-Capture Exome kit (Illumina, San Diego, CA, USA) and sequenced using the Illumina HiSeq2500 system (Illumina). Exome reads were analyzed in a standard Bioinformatics pipeline using BWA for sequence alignment to the GRCh37 reference, Broad Institute GATK for genotyping, SnpEff for variant annotation and ExomeDepth for CNV detection.^{12–16} Potentially deleterious variants detected in regions of homozygosity by descent, not present in 59 723 unrelated individuals from Exome Aggregation Consortium or in a Brazilian control population (1484 individuals) were selected for segregation analysis by Sanger sequencing. A 193-bp fragment harboring the candidate mutation was amplified using forward primer: 5'-CCATGAA CAGGAATGCAAAA-3' and reverse primer: 5'-GGGATACAAATGCCCTCTTC-3'. The reaction products were analyzed with an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), and the results were analyzed using Sequencher 5.0 (Gene Codes, Ann Arbor, MI).

Magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy analysis

Brain magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy analysis were performed on a 1.5-T whole-body Philips (Andover, MA, USA) scanner for one patient (V-17) and one healthy control.

Myo-inositol measurements in urine and plasma

To determine the total amount of myo-inositol, 100 μ l of plasma or urine was incubated with alkaline phosphatase in 0.2 M Tris-HCl at pH 8.6 for 15 min at 37 °C in a total volume of 200 μ l. Twenty-five microliters of 2 μ M inositol solution (internal standard) was added and mixed. For determination of free myo-inositol, the alkaline phosphatase step was omitted. One milliliter of acetonitrile was added while vortexing, and the precipitate was removed through a 10-min centrifugation at 14,000g at 4 °C. The supernatant was evaporated to dryness under a nitrogen stream, and 150 μ l of Tri-Sil TBT (TMSI:BSA:TMCS) reagent was added and incubated at 100 °C for 30 min. Three milliliters of hexane and 900 μ l of 0.1 M HCl were added and thoroughly mixed. The hexane layer was evaporated to dryness under a nitrogen stream, and 40 μ l of BSTFA+1%TMCS was added and incubated at 60 °C for 60 min. Sialylated sugar derivatives were separated on an Agilent 6890N GC with an FID detector using a CP-Sil 5 CB column. The concentration of inositol phosphates was estimated by subtracting free inositol from total inositol.

RESULTS

Clinical features

We evaluated nine individuals (five males; ages 38–59 years) who are descended from four closely related first-cousin couples. In all individuals, moderate to severe ID was detected. We further note that none of the subjects attended school, and all individuals either require close supervision or are dependent on external help for daily activities. They do not know how to manage money and are unable to name colors. Disruptive behaviors, sometimes aggressive and paranoid, were present in six of the nine affected individuals. A deceased sibling of patient IV-8, with a very similar phenotype, was kept locked in a room of his house for many years because of a history of inappropriate sexual behavior. Another seemingly affected younger sibling of patient IV-8 did not allow us to approach because of her very disruptive behavior. For that reason, we were unable to construct her genotype.

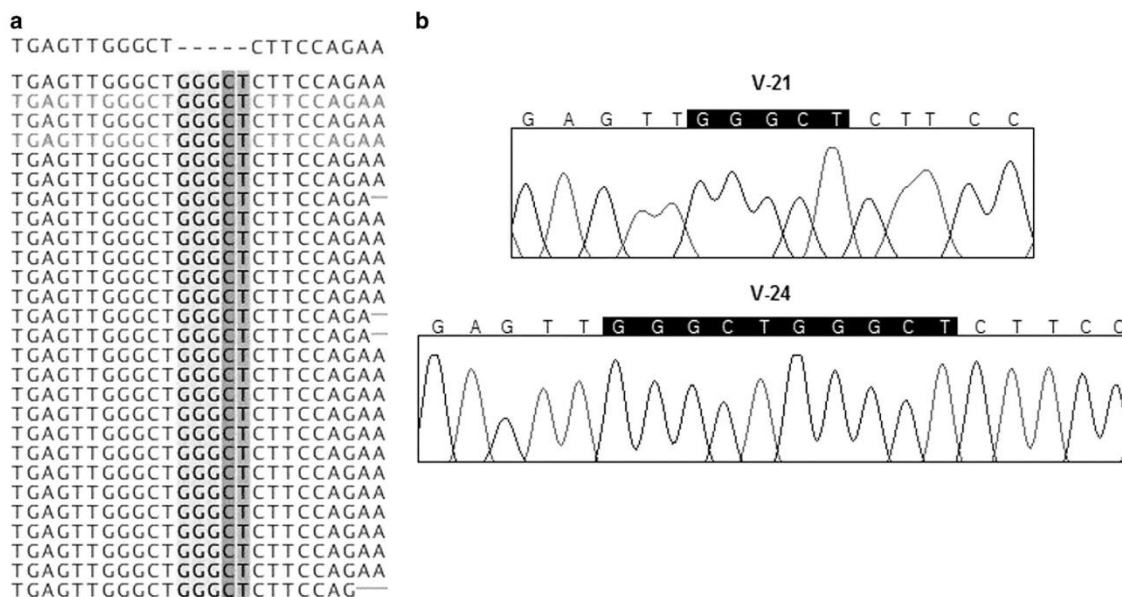


Figure 2. Mutation in *IMPA1*. (a) Whole-exome sequencing image of *IMPA1* sequence, highlighting the c.489_493dupGGGCT variant. (b) Sanger sequencing electropherograms showing homozygous control (V-21) and affected (V-24) individuals.

Linkage

Autozygosity mapping and parametric linkage analysis led to the identification of one linkage region with the maximum LOD score of 3.11 on chr8: 65,561,378-86,338,908 (8q12.3-q21.2; GRCh37/hg19). A total of 112 genes are located in the candidate region, and none were associated with autosomal recessive ID according to OMIM.¹⁷

Exome sequencing and Sanger sequencing of the candidate variant

The coverage of whole-exome sequencing with at least 10 reads was 96.84%, and every base was independently read an average of 80 times, as a total of 154,002,998 sequences were generated. We analyzed homozygous variants in a consensus coding transcript not present in controls, located in the linkage regions and in the following 26 genes associated with autosomal recessive ID according to OMIM:¹⁷ *ST3GAL3*, *PGAP1*, *CRBN*, *PRSS12*, *NSUN2*, *MED23*, *GRIK2*, *TTI2*, *TUSC3*, *TAF2*, *TRAPP9*, *MAN1B1*, *ANK3*, *KIAA1033*, *CRADD*, *HERC2*, *FBXO31*, *METTL23*, *TECR*, *ADAT3*, *KPTN*, *CC2D1A*, *NDST1*, *FMN2*, *SLC6A17* and *GPT2*. Given the target linkage region, 47 variants were identified in this region, with four of them being of low quality (filtered by GATk or erroneously genotyped as heterozygotes; Supplementary Table 1). From these 47 variants, only five were not present in the Exome Aggregation database (v0.3) (<http://exac.broadinstitute.org/>). Only two out of these five variants are exonic coding and rare, one inside a polyP region and the other the candidate variant. The variant in the PolyP region was genotyped with a low score (< 100 GATk score) and was discarded. We did not find rare variants in genes already associated with autosomal recessive ID. Therefore, the only remaining coding variant that fulfilled the criteria of possible disease-causing variant was a 5-bp duplication (c.489_493dupGGGCT; GRCh37/hg19) in homozygosis, which leads to a frameshift and premature stop codon in *IMPA1* (Figure 2). This variant cosegregated with the disease in the family (Supplementary Figure 1) and was not detected in Brazilian

population controls (1484 individuals) and in 59,723 exomes from the Exome Aggregation Consortium.

Magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy analysis

Brain magnetic resonance imaging was normal, as well as proton magnetic resonance spectroscopy analysis, which showed no reduction of the peak of *myo*-inositol (Supplementary Figure 2).

Myo-inositol measurements in urine and plasma

We did not detect a change in the *myo*-inositol or phosphoinositol content in the plasma or urine of patients with *IMPA1* homozygous loss of function when compared with healthy heterozygotes or normal controls (Supplementary Table 2).

DISCUSSION

Through a combination of homozygosity mapping, targeted exon enrichment and next-generation sequencing, we identified a homozygous loss-of-function variant in *IMPA1* in nine individuals with severe intellectual deficiency and disruptive behavior belonging to a large consanguineous family. The *IMPA1* gene codes for inositol monophosphatase, an enzyme active in the final step of dephosphorylation of polyphosphate *myo*-inositol. Nevertheless, we were not able to detect a change in the *myo*-inositol or phosphoinositol content in the plasma or urine of patients with *IMPA1* homozygous loss of function compared with healthy heterozygotes or normal controls (Supplementary Table 1). In addition, brain magnetic resonance imaging spectroscopy did not show reduction of the inositol peak in one examined patient (Supplementary Figure 1), suggesting that levels of *myo*-inositol in biological fluids and its content in some areas of the brain are not affected by *IMPA1* deficiency. Nevertheless, intracellular changes in *myo*-inositol levels or reduction of *myo*-inositol levels in specific regions of the brain cannot be ruled out.



Over the years, the overall interest in *IMPA1* function has continuously increased, as it was recognized that this enzyme is inhibited by lithium, a powerful mood stabilizer used for treatment of bipolar disorder, a psychiatric condition with high worldwide prevalence. Thus, several studies have attempted to understand the mechanism of action of lithium and its relation with *IMPA1* activity.

Cryns *et al.*⁸ characterized the phenotype of *Impa1* knockout mice. They observed that homozygote *Impa1*^{-/-} mice died *in utero* between days 9.5 and 10.5 post coitum. However, very interestingly, it was noted that inositol supplementation of pregnant mothers rescued the lethality of *Impa1*^{-/-} embryos. However, an altered circadian control and hyperactivity in the forced-swim test and open-field test were observed in *Impa1*^{-/-} rescued mice. Berry *et al.*¹⁸ demonstrated in mice that homozygous deletion of the sodium *myo*-inositol cotransporter-1 (*SMIT*), whose product is responsible for importing inositol into cells, caused lethality of mice shortly after birth. Ohnishi *et al.*¹⁹ screened an ethyl-nitrosourea mutant library for *Impa1*^{-/-} mutations and found a Thr95Lys missense mutation, which caused perinatal death of the mice and was also rescued by inositol supplementation. Homozygotes exhibited hyperlocomotive behavior and prolonged circadian periods. Furthermore, E.18.5 embryos displayed skeletal developmental defects. Andreassi *et al.*²⁰ observed that *Impa1* messenger RNA is the most abundant transcript in rat sympathetic neuron axons and that selective silencing of *Impa1* induces axon degeneration. These results highlight the importance of *myo*-inositol in the early embryonic development and survival of mice, and suggest that inositol deficiency, either by deficient synthesis, recycling or transport, is detrimental for normal development. However, the rescue of lethality in the *Impa1*^{-/-} mice by inositol supplementation indicates that increased diet supplementation can compensate for the defect in *myo*-inositol recycling and synthesis in the developing embryo. Interestingly, an important feature in adult rats receiving lithium during development was their hyperactivity, similar to *Impa1*^{-/-} mice.²¹

Up until now, only *IMPA1* and *IMPA2* are known to encode proteins with inositol monophosphatase activity in humans. Nevertheless, *IMPA2* was inhibited by lithium only at high concentrations and has much lower activity towards inositol monophosphate than does *IMPA1*.²² In mice, *Impa1* and *Impa2* have a different pattern of expression in different tissues. For example, expression in the brain is dominated by *Impa1*. In addition, the *Impa2* knockout mouse has no recognizable phenotype. In the search for potential compensatory mechanisms, no evidence of overexpression of *Impa2* was seen in *Impa1*^{-/-} mice.⁸

IMPA1 has an essential role in maintaining neuronal polarity in the mature nervous system as demonstrated by studies on the *Caenorhabditis elegans* gene, *ttx-7*, its only gene to encode an inositol monophosphatase.^{23,24} Mutations in *ttx-7* cause defects in sensory behavior and localization of both pre- and post-synaptic proteins in RIA neurons and pivotal interneurons. Both behavioral and localization defects in *ttx-7* mutants were rescued by either expression of *ttx-7* in adults, forced expression of human IMPase proteins, or by inositol supplementation.^{23–25} As shown by Tanizawa *et al.*,²³ the synaptic localization defects in *ttx-7* mutants occurred exclusively in RIA neurons. In addition, this study showed that inositol monophosphatase is involved in a specialized part of cell phosphatidylinositol metabolism.

Thus, we can speculate that the inhibition of *IMPA1* in humans may have an effect on a specific group of neurons and/or affect a specific metabolic phosphatidylinositol pathway. The fact that we were not able to observe reduced inositol peak in one patient subjected to a brain magnetic resonance imaging spectroscopy does not rule out the possibility of inositol depletion as a mechanism of the ID. Various studies suggested the existence of

several pools of inositol in the brain.^{8,26} Lack of *IMPA1* activity causing inositol depletion would be more likely to occur in cells with a highly active phosphatidylinositol cycle, leading to inositol depletion and causing irreversible brain damage.⁸

Several ID genes are involved in neurotransmitter release by exocytosis.²⁷ It has been shown that phosphoinositides, which are derived from combinational phosphorylation of phosphatidylinositol, have important roles through the Ca²⁺-dependent mobilization of secretory vesicles to the plasma membrane.^{28,29} In neurons and neuroendocrine cells, regulated secretion requires a calcium-dependent fusion of transmitter-containing vesicles with the plasma membrane. Furthermore, reduction of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate potentiates neuroexocytosis and leads to neuronal degeneration, a mechanism that has been linked to certain forms of Charcot-Marie-Tooth disease and amyotrophic lateral sclerosis.³⁰

In short, the strategy of combining field investigation in highly inbred areas of Brazil, searching for clusters of genetic disorders, with a state-of-art molecular approach proved once again to be successful. Using this approach, our group has recently identified, in a neighboring community, *MED25* as another gene associated with autosomal recessive ID.¹⁶

Now we report the identification of a novel homozygous duplication of 5 bp in *IMPA1*, in a large consanguineous family with nine individuals with severe ID and disruptive behavior. *IMPA1* encodes inositol monophosphatase 1, a key target for lithium, the leading drug for treatment of bipolar disorder. This is the first observation of a human disease involving inositol recycling and its *de novo* synthesis pathway, enhancing our comprehension of the pathophysiology of ID and psychiatric disorders. The effect of inositol supplementation in individuals with *IMPA1* deficiency will be the subject of future studies.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This investigation would not have been possible without the contribution of many Public Health Agents from the Family's Health Program of several municipalities of Paraíba State, Brazil. This manuscript is dedicated to all families involved in this study. This study was financially supported by the UEPB/PROPESQ, FAPESQ/CNPq/PPSUS, CAPES, CNPq/INCT and FAPESP/CEPID.

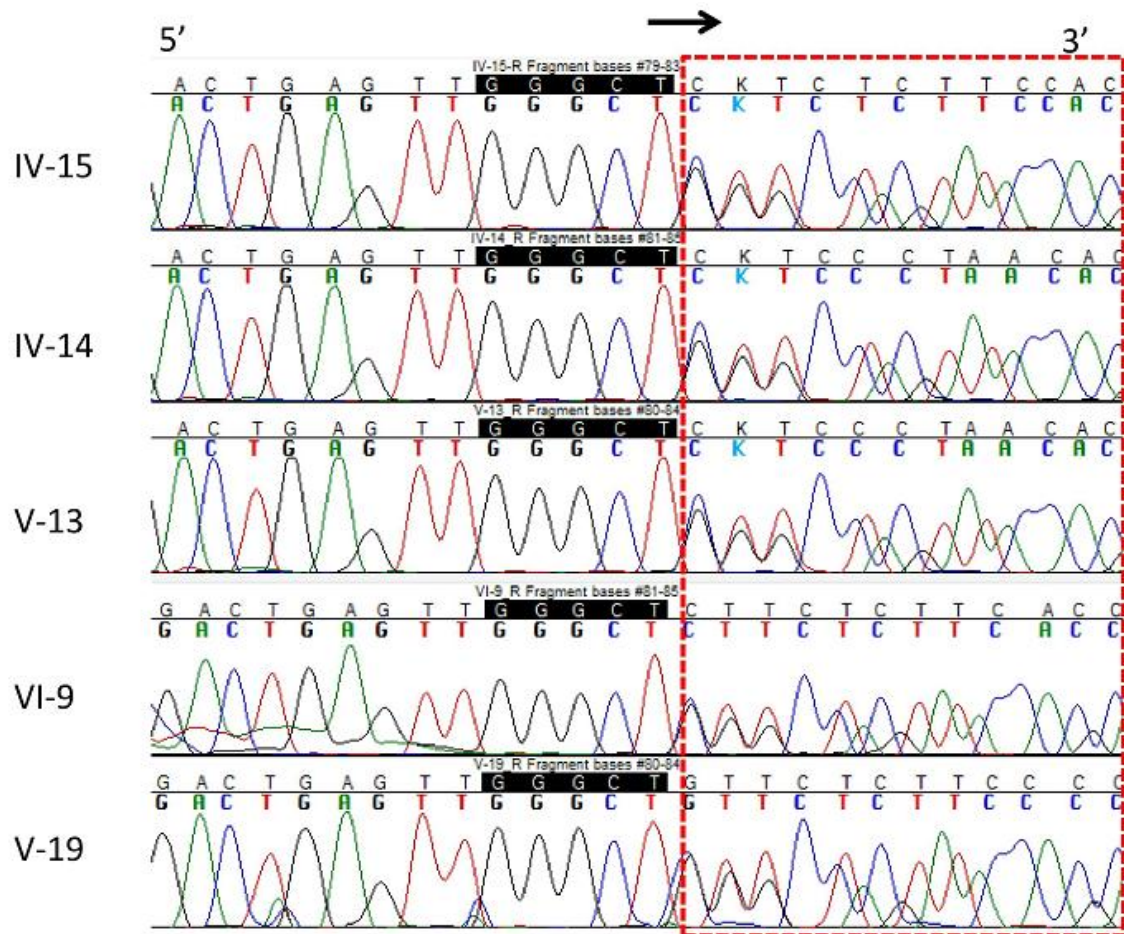
REFERENCES

- 1 American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association: Washington, DC, USA, 2000.
- 2 Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; **8**: 117–134.
- 3 Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C *et al.* Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* 2006; **140**: 2063–2074.
- 4 Ellison JW, Rosenfeld JA, Shaffer LG. Genetic basis of intellectual disability. *Annu Rev Med* 2013; **64**: 441–450.
- 5 Resnick AC, Saiardi A. Inositol polyphosphate multikinase: metabolic architect of nuclear inositides. *Front Biosci* 2008; **13**: 856–866.
- 6 Hakim S, Bertucci MC, Conduit SE, Vuong DL, Mitchell CA. Inositol polyphosphate phosphatases in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012; **362**: 247–314.
- 7 Atack JR, Broughton HB, Pollack SJ. Inositol monophosphatase—a putative target for Li⁺ in the treatment of bipolar disorder. *Trends Neurosci* 1995; **18**: 343–349.
- 8 Cryns K, Shamir A, Van Acker N, Levi I, Daneels G, Goris I *et al.* *IMPA1* is essential for embryonic development and lithium-like pilocarpine sensitivity. *Neuropsychopharmacology* 2008; **33**: 674–684.
- 9 Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nürnberg P. HomozygosityMapper—an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: 593–599.
- 10 Ruschendorf F, Nürnberg P. ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10k SNP array data. *Bioinformatics* 2005; **12**: 2123–2125.

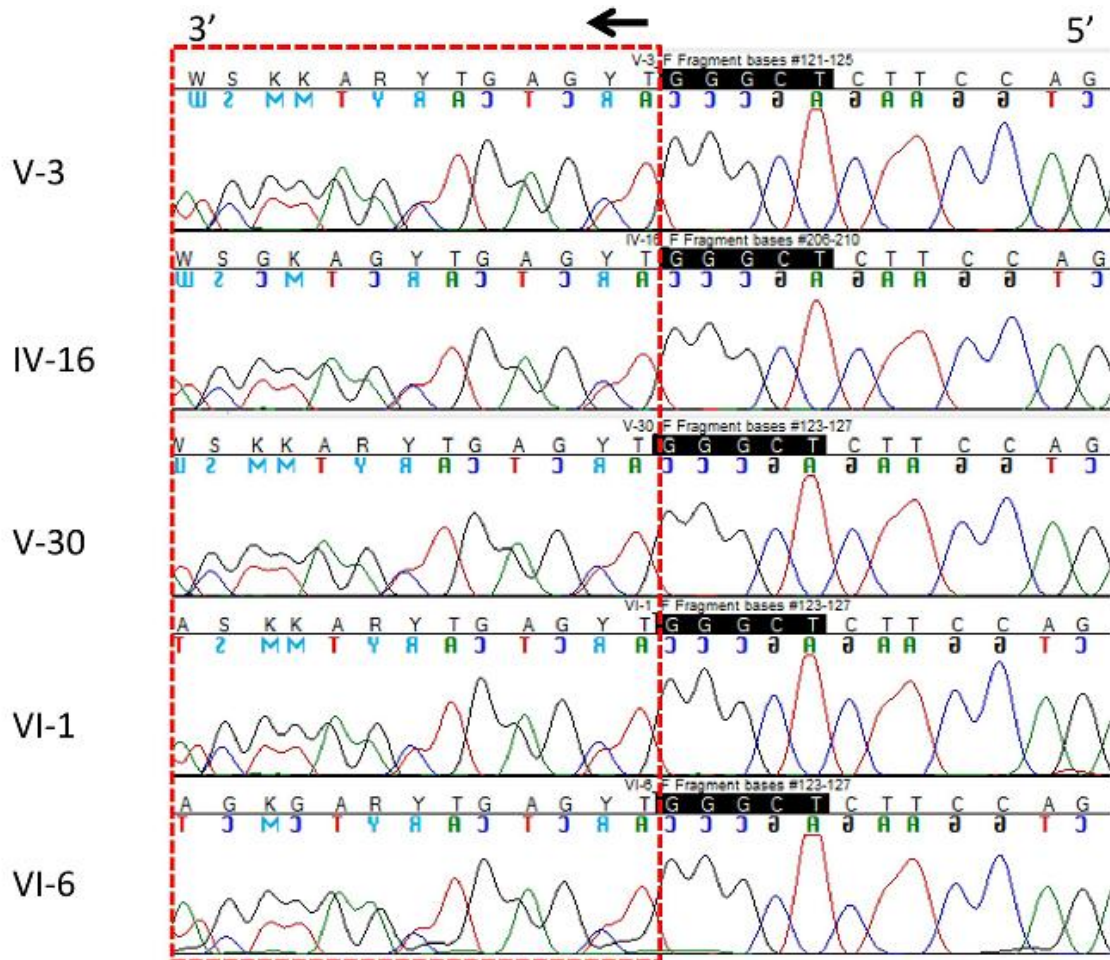
- 11 Abecasis G, Cherny S, Cookson W, Cardon L. Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 2002; **30**: 97–101.
- 12 Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2010; **26**: 589–595.
- 13 McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A *et al*. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010; **20**: 1297–1303.
- 14 Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L *et al*. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 2012; **6**: 80–92.
- 15 Plagnol V, Curtis J, Epstein M, Mok KY, Stebbings E, Grigoriadou S *et al*. A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics* 2012; **28**: 2747–2754.
- 16 Figueiredo T, Melo US, Pessoa AL, Nobrega PR, Kitajima JP, Correia I *et al*. Homozygous missense mutation in *MED25* segregates with syndromic intellectual disability in a large consanguineous family. *J Med Genet* 2015; **52**: 123–127.
- 17 OMIM. OMIM database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- 18 Berry GT, Wu S, Buccafusca R, Ren J, Gonzales LW, Ballard PL *et al*. Loss of murine *Na⁺/myo-inositol cotransporter* leads to brain myo-inositol depletion and central apnea. *J Biol Chem* 2003; **278**: 18297–18302.
- 19 Ohnishi T, Murata T, Watanabe A, Hida A, Ohba H, Iwayama Y *et al*. Defective craniofacial development and brain function in a mouse model for depletion of intracellular inositol synthesis. *J Biol Chem* 2014; **289**: 10785–10796.
- 20 Andreassi C, Zimmermann C, Mitter R, Fusco S, De Vita S, Saiardi A *et al*. An NGF-responsive element targets myo-inositol monophosphatase-1 mRNA to sympathetic neuron axons. *Nat Neurosci* 2010; **13**: 291–301.
- 21 Ohnishi T, Ohba H, Seo KC, Im J, Sato Y, Iwayama Y *et al*. Spatial expression patterns and biochemical properties distinguish a second myo-inositol monophosphatase *IMPA2* from *IMPA1*. *J Biol Chem* 2007; **282**: 637–646.
- 22 Youngs RM, Chu MS, Meloni EG, Naydenov A, Carlezon WA Jr, Konradi C. Lithium administration to preadolescent rats causes long-lasting increases in anxiety-LIKE behavior and has molecular consequences. *J Neurosci* 2006; **26**: 6031–6039.
- 23 Tanizawa Y, Kuhara A, Inada H, Kodama E, Mizuno T, Mori I. Inositol monophosphatase regulates localization of synaptic components and behavior in the mature nervous system of *C. elegans*. *Genes Dev* 2006; **20**: 3296–3310.
- 24 Kimata T, Tanizawa Y, Can Y, Ikeda S, Kuhara A, Mori I. Synaptic polarity depends on phosphatidylinositol signaling regulated by myo-inositol monophosphatase in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 2012; **191**: 509–521.
- 25 Ohnishi T, Tanizawa Y, Watanabe A, Nakamura T, Ohba H, Hirata H. Human myo-inositol monophosphatase 2 rescues the nematode thermotaxis mutant *ttx-7* more efficiently than *IMPA1*: functional and evolutionary considerations of the two mammalian myo-inositol monophosphatase genes. *J Neurochem* 2013; **124**: 685–694.
- 26 Fisher SK, Novak JE, Agranoff BW. Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J Neurochem* 2012; **82**: 736–754.
- 27 Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W *et al*. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 2011; **478**: 57–63.
- 28 Arimura N, Kaibuchi K. Key regulators in neuronal polarity. *Neuron* 2005; **48**: 881–884.
- 29 Arimura N, Kaibuchi K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007; **8**: 194–205.
- 30 Wen PJ, Osborne SL, Meunier FA. Phosphoinositides in neuroexocytosis and neuronal diseases. In: Falasca M (ed) *Phosphoinositides and Disease*. Springer: London, UK, 2012 pp 87–98.

Supplementary Information accompanies the paper on the Molecular Psychiatry website (<http://www.nature.com/mp>)

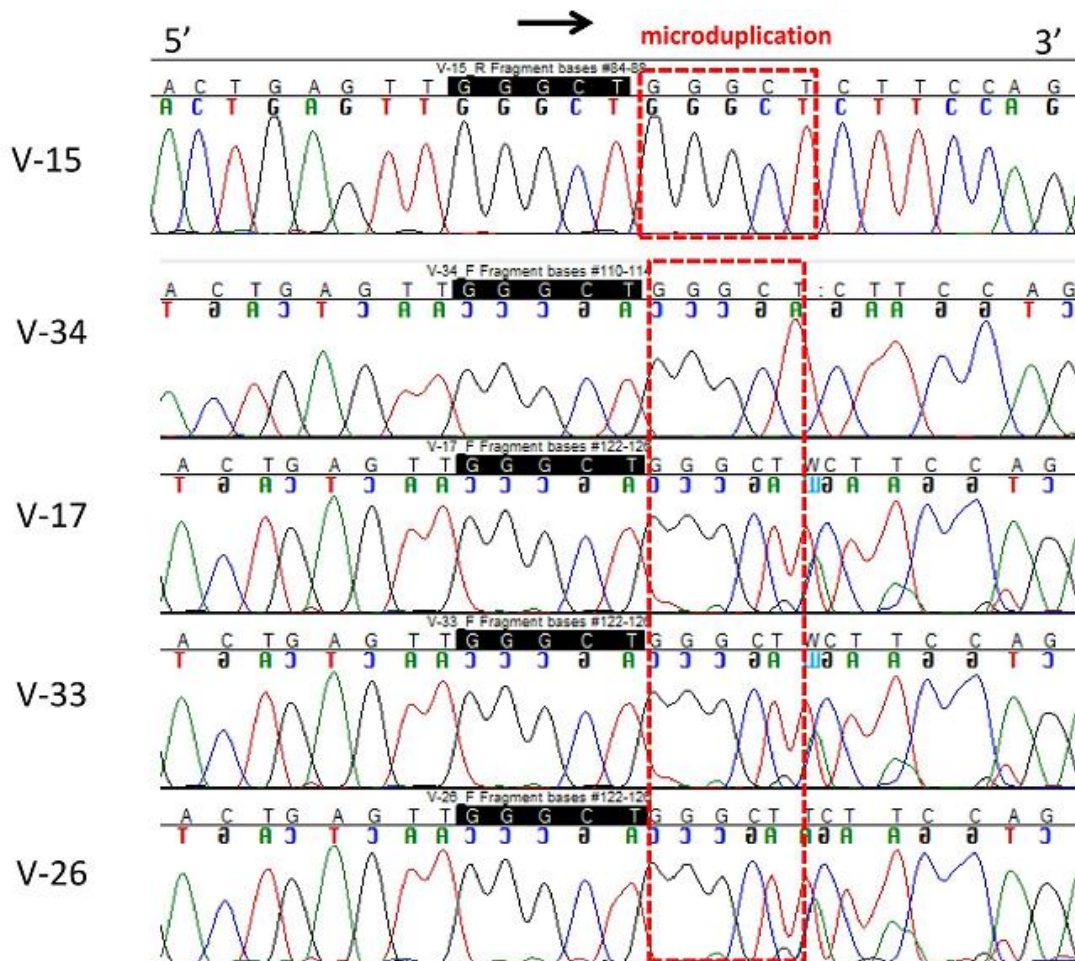
Heterozygotes – Forward strand



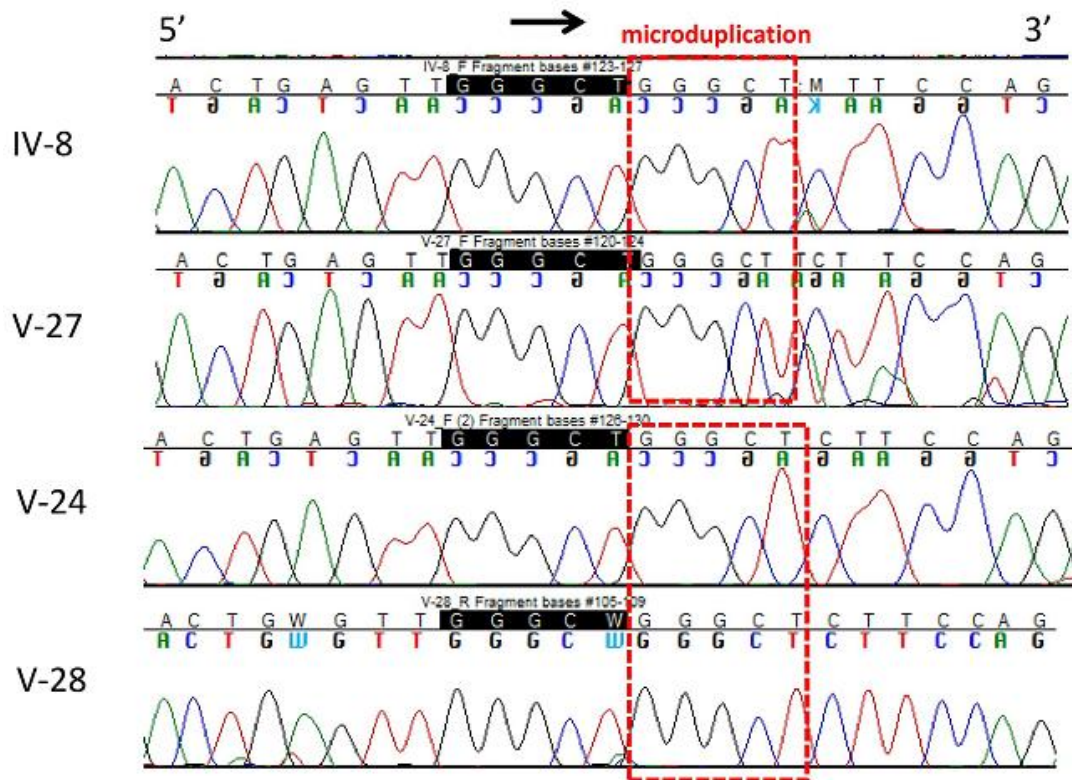
Heterozygotes – Reverse strand



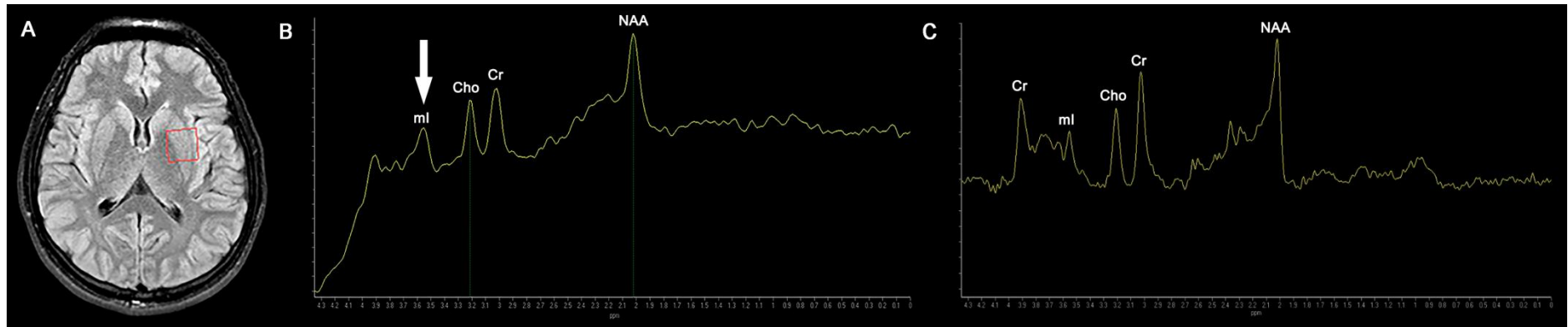
Homozygotes



Homozygotes



Supplementary Figure 1. Mutation in *IMPA1* cosegregated with the disease in the family. Sanger sequencing electropherograms showing healthy controls, heterozygotes and homozygotes individuals.



Supplementary Figure 2. Magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy analysis of patient (V-17) and a healthy control. Head MRI, axial FLAIR image (A) discloses normal appearance of both cerebral hemispheres in patient (V-17). The red square centered in the left basal ganglia region points to the location where MR spectroscopy was acquired. MR spectroscopy (B) using the single voxel approach, the PRESS (Point-RESolved Spectroscopy) technique, and an echo time of 31 ms demonstrates a normal metabolic profile, including a normal myo-inositol peak (mI, arrow), in patient (V-17). Legend: Cho = choline; Cr = creatine; NAA = N-acetyl aspartate; ppm = parts per million. MR spectroscopy data from an age-matched normal subject, acquired with the same parameters, is shown in (C) for comparison.

Supplementary Table 1. Variants identified in linkage region.

Chr	Pos (b37/hg19)	Ref	Alt	GATk Score	GATk Filter	Genotype (1/1 = homozig; 0/1 = heterozig)	EXAC V0.3 MAF=0	UCSC dbSNP 142 <= 1%	Mutation
8	66620359	G	A	13309,01	PASS	1/1			
8	67380528	T	C	2527,71	PASS	1/1			
8	67590460	C	T	1435,77	PASS	1/1			
8	67592152	T	C	31831,02	PASS	1/1			
8	68864728	G	A	190372,77	PASS	1/1			
8	69136871	T	A	1340,77	PASS	1/1			
8	69143589	A	G	1343,77	PASS	1/1			
8	69434195	T	C	4212,71	PASS	1/1			
8	69699756	G	A	8299,79	PASS	1/1			
8	70744812	G	A	258,8	PASS	1/1			
8	71486568	G	C	4812,71	PASS	1/1			
8	71550144	A	G	1480,77	PASS	1/1			
8	71593425	G	A	268966,42	PASS	1/1			
8	72184119	G	T	9225,77	VQSRTTrancheSNP99.70to99.90	1/1			
8	72932259	C	T	63686,82	PASS	1/1			
8	72942210	G	T	289465,52	PASS	1/1			
8	72946622	TA	T	3891,64	PASS	0/1	X	X	intronic
8	72948588	C	T	36831,74	PASS	1/1			
8	72963109	G	A	42940,53	PASS	1/1			
8	73926236	T	G	1226,77	PASS	1/1			
8	73982161	A	G	234,84	PASS	1/1			
8	74169337	T	C	1855,77	PASS	1/1			
8	74527996	C	T	28048,62	PASS	1/1			
8	74581290	A	AG	498894,3	PASS	1/1			
8	74888494	C	T	108368,53	PASS	1/1			

Chr	Pos (b37/hg19)	Ref	Alt	GATk Score	GATk Filter	Genotype (1/1 = homozig; 0/1 = heterozig)	EXAC V0.3 MAF=0	UCSC dbSNP 142 <= 1%	Mutation
8	74893880	C	T	219333,22	PASS	1/1			
8	74894748	A	G	108476,53	PASS	1/1			
8	74917084	A	G	107872,96	PASS	1/1			
8	75262798	G	C	816388,73	PASS	1/1			
8	75277399	A	G	724501,73	PASS	1/1			
8	75614614	C	A	1660,77	PASS	1/1			
8	76468309	GT	G	111,77	PASS	0/1	X		
8	77745635	G	A	3805,98	PASS	1/1			
8	77765298	ACCT	A	92,28	PASS	1/1	X	X	loss of one AA P inside a poly-P
8	77765398	A	G	1447,77	PASS	1/1			
8	77768390	T	G	8733,27	PASS	1/1			
8	77895865	A	G	451474,73	PASS	1/1			
8	79610710	A	G	103170,99	PASS	1/1			
8	80831393	TA	T	31,77	PASS	0/1	X		intronic
8	81083598	AGCCCGAGT	A	20228,05	PASS	1/1			
8	82583246	G	GAGCCC	1872,77	PASS	1/1	X	X	candidate
8	82590822	C	G	306,78	PASS	1/1			
8	82590861	G	A	325,77	PASS	1/1			
8	82607148	C	T	1473,77	PASS	1/1			
8	82626146	G	A	2934,71	PASS	1/1			
8	82727569	T	C	60301,11	PASS	1/1			
8	86126827	C	CAACATT	181889,92	PASS	1/1			

Supplementary Table 1. Variants identified in linkage region. Autozygosity mapping and parametric linkage analysis led to the identification of one linkage region with the maximum LOD score of 3.11 on chr8: 65,561,378 - 86,338,908 (GRCh37/hg19). Given the target linkage region, 47 variants were identified in this region. From these 47 variants, only 5 were not present in the Exome Aggregation database (v0.3) (It is identified with an "X" in column H).

Legend: Ref = reference; Alt = alteration.

Supplementary Table 2. Myo-inositol measurements in urine and plasma

Individuals	Sample ID	Genotype	myo-inositol μmol/l	myo-inositol- phosphate	myo-inositol μmol/l	myo-inositol- phosphate	Sample ID	umol myo inositol/mmol creatinine
			Apr 8, 2014		Oct 10, 2014			Apr 8, 2014
IV-8	PLASMA	mut/mut	11.91		8.87			
	PLA_AP		14.32	2.41	16.32	7.45	URI	7.2
V-17	PLASMA	mut/mut	13.17		10.16			
	PLA_AP		20.67	7.5	16.7	6.54	URI	3.1
V-15	PLASMA	mut/mut	10.21		8.68			
	PLA_AP		13.52	3.31	12.03	3.35	URI	3
V-27	PLASMA	mut/mut	15.57		17.2			
	PLA_AP		21.98	6.41	27.7	10.5	URI	3.6
V-24	PLASMA	mut/mut	13.23		14.6			
	PLA_AP		16.96	3.73	22.37	7.77	X	X
V-26	PLASMA	mut/mut	12.76		13.79			
	PLA_AP		21.43	8.67	21.07	7.28	X	X
V-34	PLASMA	mut/mut	X		9.39			
	PLA_AP		X	X	15.77	6.38	X	X
V-28	PLASMA	mut/mut	10.57		11.9			
	PLA_AP		18.64	8.07	18.23	6.33	X	X
VI-9	PLASMA	wt/mut	X		9.67			
	PLA_AP		X	X	15.72	6.05	URI	6.9
V-30	PLASMA	wt/mut	X		13.32			
	PLA_AP		X	X	21.59	8.27	X	X
IV-16	PLASMA	wt/mut	X		12.36			
	PLA_AP		X	X	20.49	8.13	X	X
IV-15	PLASMA	wt/mut	X		11.45			
	PLA_AP		X	X	16.83	5.38	X	X
VI-1	PLASMA	wt/mut	10.6		X			
	PLA_AP		18.76	8.16	X	X	URI	4.1
IV-14	PLASMA	wt/mut	X		17.73			
	PLA_AP		X	X	24.92	7.19	X	X
VI-6	PLASMA	wt/mut	X		13.04			
	PLA_AP		X	X	23.42	10.38	X	X
V-19	PLASMA	wt/mut	17.64		16.27			
	PLA_AP		30.82	13.18	23.22	6.95	URI	4.7
V-13	PLASMA	wt/mut	13.66		12.68			
	PLA_AP		22.23	8.57	21.1	8.42	URI	1.9
V-18	PLASMA	wt/wt	X		10.57			
	PLA_AP		X	X	17.55	6.98	X	X
V-31	PLASMA	wt/wt	X		13.33			
	PLA_AP		X	X	20.35	7.02	X	X
V-29	PLASMA	wt/wt	X		12.1			

Supplementary Table 2. Myo-inositol measurements in urine and plasma

	PLA_AP		X	X	20.84	8.74	X	X
V-11	PLASMA	wt/wt	11.1		9.11			
	PLA_AP		19.84	8.74	17.41	8.3	URI	10.1
IV-6	PLASMA	wt/wt	13.2		11.27			
	PLA_AP		21.56	8.36	18.96	7.69	URI	11.4

Supplementary Table 2. Myo-inositol measurements in urine and plasma from family members. Healthy controls (V-18,V-31, V-29, V-11 and IV-6); Heterozygotes (VI-9,V-30, IV-16, IV-15, VI-1, IV-14, VI-6, V-19 and V-13); and Homozygotes individuals (IV-8, V-17, V-15, V-27, V-24, V-26, V-34 and V-28). We performed two measurements in blood plasma using different samples (Dates: Apr 8, 2014; and Oct 10, 2014). Legend: PLA_AP = plasma incubated with alkaline phosphatase; X = unmeasured.

7. RESULTADO COMPLEMENTAR

7.1. DIAGNÓSTICO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO DA DEFICIÊNCIA INTELECTUAL ASSOCIADA AO GENE *IMPA1*

Pequenas inserções e deleções podem ser detectadas com base em diferenças no comprimento de fragmentos de DNA produzidos pela clivagem com enzimas de restrição, que cortam o DNA em sequências específicas reconhecidas por essas enzimas, o que torna possível a diferenciação entre alelos normais e mutantes (STRACHAN e READ, 2002). A mutação c.489_483dupGGGCT no gene *IMPA1* criou um sítio de restrição para a enzima *BseYI*, de acordo com o esquema abaixo:

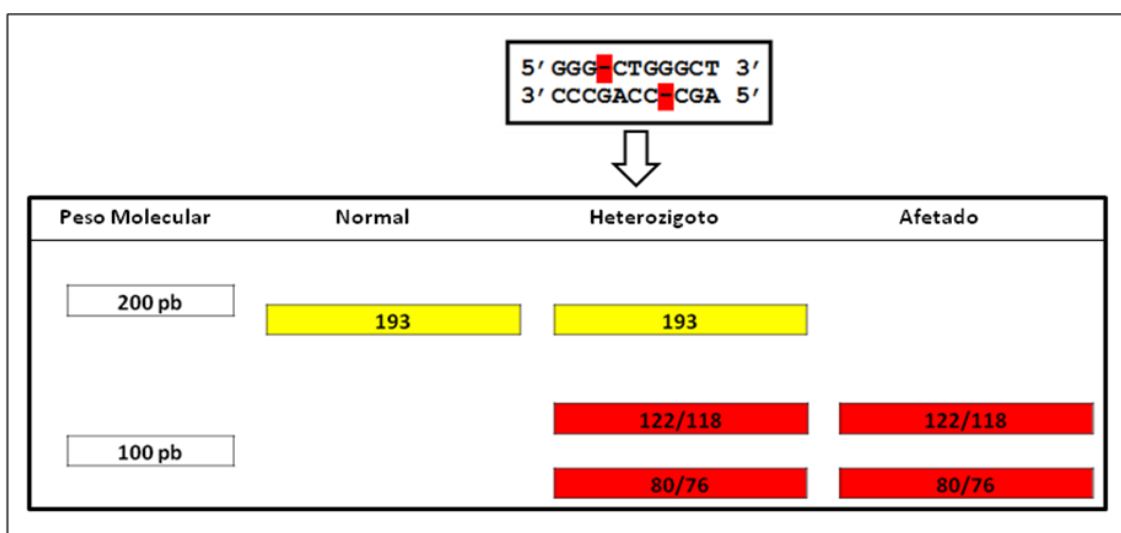


Figura 11. Esquema demonstrando o sítio de restrição da enzima *BseYI* e o padrão de bandas gerado a partir da digestão enzimática.

A digestão de DNA por enzimas de restrição é um processo simples. Basta colocar o DNA em contato com a enzima a uma temperatura ideal (geralmente 37°C) e a enzima inicia o processo de digestão imediatamente, cortando o DNA em padrões específicos. O resultado foi revelado a partir da eletroforese em gel poliacrilamida (figura 12).

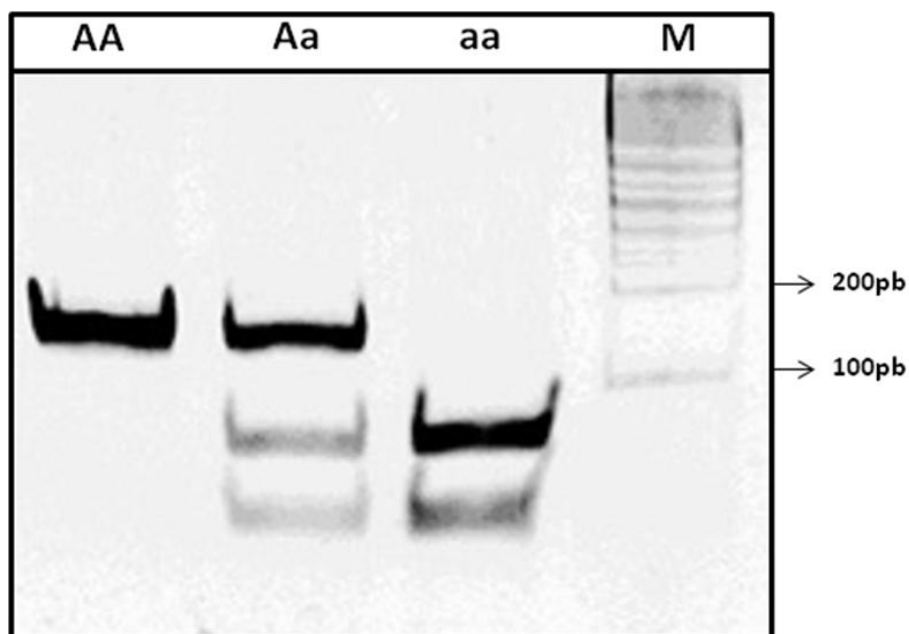


Figura 12. Gel em poliacrilamida com padrão de bandas geradas pela digestão enzimática com a endonuclease BseYI. Homozigoto normal (AA); heterozigoto (Aa); afetado (aa); marcador de peso molecular de 100 pb (M).

O indivíduo normal (AA) apresentou uma única banda com peso molecular de 193 pb; o indivíduo heterozigoto (Aa) apresentou três bandas com os seguintes pesos moleculares: uma banda mais forte com 193 pb, uma segunda banda com 122/118 pb e uma terceira banda com 80/76 pb; já o indivíduo afetado com a deficiência intelectual autossômica recessiva associada ao gene *IMPA1* apresentou o padrão de duas bandas, uma com 122/118 pb e outra com 80/76 pb. Portanto, a partir do resultado obtido, conseguimos realizar o diagnóstico dos afetados de forma mais simples, rápida e econômica, não sendo necessário o uso de sequenciamento de DNA. Além disso, permite identificar, com facilidade, heterozigotos em amostras de jovens em início da idade reprodutiva definindo as populações em risco de gerar indivíduos afetados.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a identificação das mutações nos genes *MED25* e *IMPA1* nas duas famílias estudadas neste trabalho, triamos outros 18 indivíduos com DI de outras famílias consanguíneas que residiam na região prospectada para verificar se tinham as mesmas mutações identificadas. Entretanto, nenhum dos pacientes possuía as mutações em um dos dois genes estudados. Logo, podemos dizer que, provavelmente, outros genes ainda não associados à DI podem ser identificados nessas populações.

A parceria entre pesquisadores e os gestores municipais foi importante e serve para orientar políticas públicas e definir a necessidade de oferta de serviços especializados de saúde. Vários especialistas recomendam fortemente o investimento em estudos epidemiológicos para determinação da prevalência de doenças genéticas e demandas por serviços específicos. No Brasil, embora tenha sido regulamentada a Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica no SUS por meio da portaria nº 81 de 20 de janeiro de 2009, os poucos serviços de Genética Médica estão concentrados nos estados do Sudeste e são oferecidos principalmente por pesquisadores em centros de referência universitários. Com o investimento na área da Genética Médica, os gestores municipais podem reduzir custos com despesas desnecessárias, caso seus pacientes tenham acesso ao diagnóstico clínico-genético e orientações sobre prognóstico, tratamento e prevenção.

Como perspectiva futura, pretendemos:

1. Ampliar nossa parceria com outros municípios para investigar outros casos de DIAR, com o intuito de oferecer diagnóstico e aconselhamento genético.
2. Organizar um ensaio clínico de suplementação oral de mio-inositol, uma substância de baixo custo e de ampla disponibilidade, para avaliar se há benefício no comportamento e no desempenho cognitivo em indivíduos com mutação em *IMPA1*. Esse estudo deverá procurar financiamento a fim de ser adequadamente conduzido.
3. Ampliar a investigação da variante c.489_493dupGGGCT em *IMPA1* na população com DI na região em que foram detectados pacientes com essa variante em homozigose. Para isso, será utilizada a técnica de amplificação da região mutada por reação em cadeia de polimerase e digestão com enzima de restrição, já padronizada neste trabalho.
4. Investigar, em neurônios gerados a partir de células iPS (do inglês, *induced pluripotent stem cells*) de pacientes com deficiência de *IMPA1*, o funcionamento do

ciclo do inositol, a fim de estabelecer o mecanismo de ação responsável pelo fenótipo clínico dessa doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAMR (*American Association on Mental Retardation*). **Retardo Mental – Definição, Classificação e Sistemas de Apoio**. 10^a.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ABBASI-MOHEB, L.; MERTEL, S.; GONSIOR, M. *et al.* Mutations in NSUN2 cause autosomal-recessive intellectual disability. **Am. J. Hum. Genet.** v. 90, p. 847-855, 2012.
- ABECASIS, G.; CHERNY, S.; COOKSON, W. *et al.* Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. **Nat. Genet.** v. 30, p. 97-101, 2002.
- ABOU JAMRA, R. A.; WOHLFART, S.; ZWEIER, M. *et al.* Homozygosity mapping in 64 Syrian consanguineous families with non-specific intellectual disability reveals 11 novel loci and high heterogeneity. **Europ. J. Hum. Genet.** v. 19, p. 1161-1166, 2011.
- ALAZAMI, A. M.; HIJAZI, H.; AL-DOSARI, M. S. *et al.* Mutation in ADAT3, encoding adenosine deaminase acting on transfer RNA, causes intellectual disability and strabismus. **J. Med. Genet.** v. 50, p. 425-430, 2013.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA (American Psychiatric Association). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders, Text Revision**. 4th ed. Washington: American Psychiatric Association; 2000.
- BAPLE, E. L.; MAROOFIAN, R.; CHIOZA, B. A. *et al.* Mutations in KPTN cause macrocephaly, neurodevelopmental delay, and seizures. **Am. J. Hum. Genet.** v. 94, p. 87-94, 2014.
- BASEL-VANAGAITE, L.; ATTIA, R.; YAHAV, M. *et al.* The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation. **J. Med. Genet.** v. 43, p. 203-210, 2006.
- BASEL-VANAGAITE, L.; SMIRIN-YOSEF, P.; ESSAKOW, J.P. *et al.* Homozygous *MED25* mutation implicated in eye-intellectual disability syndrome. **Hum. Gene.** v. 134, n. 6, 2015.
- BENÍTEZ-BRIBIESCA L; ROSA-ALVAREZ I; MANSILLA-OLIVARES A. Dendritic spine pathology in infants with severe protein-calorie malnutrition. **Pediatrics.** v.104, 1999.
- BERNKOPF, M.; WEBERSINKE, G.; TONGSOOK, C. *et al.* Disruption of the methyltransferase-like 23 gene *METTL23* causes mild autosomal recessive intellectual disability. **Hum. Molec. Genet.** v. 23, p. 4015-4023, 2014.
- BOURBON, H. Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, fourmodule transcriptional mediator complex. **Nucleic. Acids. Res.** v. 36, n. 12, p. 3993-4008, 2008.

- BRANCHI, I.; BICHLER, Z.; BERGER-SWEENEY, J. *et al.* Animal models of mental retardation: from gene to cognitive function. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 27, p. 141-153, 2003.
- CALISKAN, M.; CHONG, J. X.; URICCHIO, L. *et al.* Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the *TECR* gene on chromosome 19p13. **Hum. Molec. Genet.** v. 20, p. 1285-1289, 2011.
- CELIS, K.; SHULDINER, S.; HAVERFIELD, E. V. *et al.* Loss of function mutation in glutamic pyruvate transaminase 2 (*GPT2*) causes developmental encephalopathy. **J. Inherit. Metab. Dis.** 2015.
- CENTERWALL, A.S.; CENTERWALL W.R. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. **Pediatrics.** v. 105, p. 89-103, 2000.
- CID-10. **Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde.** 10ª rev. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997.
- COFFEE, B.; KEITH, K.; ALBIZUA, I. *et al.* Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated *FMR1* DNA. **Am. J. Hum. Genet.** v. 85, p. 503-514, 2009.
- CONTRACTOR, A; SWANSON, G; HEINEMANN, S.F. Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. **Neuron.** v. 29:209–216, 2001.
- CÓRDOBA, M.; RODRIGUES, S. GONZÁLEZ, M.D. *et al.* Expanding the spectrum of *Grik2* mutations: intellectual disability, behavioural disorder, epilepsy and dystonia. **Clin Genet.** v. 87, n. 3, p. 293-295, 2015.
- CRYNS, K.; SHAMIR, A.; VAN ACKER, N. *et al.* *IMPA1* is essential for embryonic development and lithium-like pilocarpine sensitivity. **Neuropsychopharmacology** v. 33, p. 674-684, 2008.
- DSM-IV. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais.** Trad. Cláudia Dornelles; 4ª ed. Ver. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- DURKIN, M.S.; HASAN, Z.M.; HASAN K.Z. Prevalence and correlates of mental retardation among children in Karachi, Pakistan. **Am J Epidemiol.** v. 147, p. 281–8, 1998.
- DURKIN, M. The epidemiology of developmental disabilities in low income countries. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev.** v. 8, p. 206-211, 2002.
- EDVARDSON, S.; BAUMANN, A.M., MUHLENHOFF, M. *et al.* West syndrome caused by *ST3Gal-III* deficiency. **Epilepsia.** v. 54: e24-e27, 2013.

- EMERSON, E. Poverty and people with intellectual disabilities. **Ment Retard DevDisabil Res Rev.** v. 13, n.2, p. 107-113, 2007.
- FEDULOV, V.; REX, C.S.; SIMMONS, D.A. *et al.* Evidence that long-term potentiation occurs within individual hippocampal synapses during learning. **J Neurosci.** v. 27, n.30, p. 8031-8039, 2007.
- FREIRE-MAIA, N. Inbreeding in Brazil. **Am. J. Hum. Gen.** v. 9, p. 284-298, 1957.
- FREIRE-MAIA, N. Genetic Effects in Brazilian Populations due to Consanguineous Marriages. **Am. J. Med. Gen.** v. 35, p. 115-117, 1989.
- FRIEDMAN, E.; HOAU-YAN-WANG, LEVINSON, D. Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective. **Biol Psychiatry.** v. 33, n. 7, p. 520-525, 1993.
- GARSHASBI, M.; KAHRIZI, K.; HOSSEINI, M. *et al.* A novel nonsense mutation in TUSC3 is responsible for non-syndromic autosomal recessive mental retardation in a consanguineous Iranian family. **Am. J. Med. Genet.** v. 155^a, p. 1976-1980, 2011.
- GOODWIN, F.K.; JAMISON, K.R. **Manic-Depressive Illness.** New York: Oxford University Press, 1990.
- GUILMATRE, A.; DUBOURG, C.; MOSCA A.L. *et al.* Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. **Arch. Gen. Psychiatry** v. 66, p. 947-56, 2009.
- HAHN, C.G.; FRIEDMAN, E. Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder. **Bipolar Disord.** v. 1, n. 2, p. 81-86, 1999.
- HALLCHER, L.M.; SHERMAN, W.R. The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. **J. Biol. Chem.** v. 255, p. 10896-10901, 1980.
- HAMDAN, F.F.; GAUTHIER, J.; ARAKI, Y. *et al.* Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. **Am. J. Hum. Genet.** v. 88, p. 306-316, 2011.
- HASHIMOTO, S.; BOISSEL, S.; ZARHRATE, M. *et al.* MED23 mutation links intellectual disability to dysregulation of immediate early gene expression. **Science.** v. 333, p. 1161-1163, 2011.
- HELLMAN-AHARONY, S.; SMIRIN-YOSEF, P.; HALEVY, A. *et al.* Microcephaly thin corpus callosum intellectual disability syndrome caused by mutated TAF2. **Pediat. Neurol.** v. 49, p. 411-416, 2013.

- HERBIG, E., WARFIELD, L., FISH, L. *et al.* Mechanism of mediator recruitment by tandem repeat Gcn4 activation domains and three Gal11 activator-binding domains. **Mol. Cel. Biol.** v. 30, n. 10, p. 2376-2390, 2010.
- HIGGINS, J.J.; PUCILOWSKA, J.; LOMBARDI, R.Q. *et al.* A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. **Neurology.** v. 63, p. 1927-1931, 2004.
- HU, H.; EGGERS, K.; CHEN, W. *et al.* ST3GAL3 mutations impair the development of higher cognitive functions. **Am. J. Hum. Genet.** v. 89, p. 407-414, 2011.
- IQBAL, Z.; VANDEWEYER, G.; VAN DER VOET, M. *et al.* Homozygous and heterozygous disruptions of ANK3: at the crossroads of neurodevelopmental and psychiatric disorders. **Hum. Molec. Genet.** v. 22, p. 1960-1970, 2013.
- IQBAL, Z.; WILLEMSSEN, M.H.; PAPON, M.A. *et al.* Homozygous SLC6A17 mutations cause autosomal-recessive intellectual disability with progressive tremor, speech impairment, and behavioral problems. **Am. J. Hum. Genet.** 96: 386-396, 2015.
- JOPE, R.S.; SONG, L.; LI, P.P. *et al.* The phosphoinositide signal transduction system is impaired in bipolar affective disorder brain. **J Neurochem.** v. 66, n. 6, p. 2404-2409, 1996.
- KABRA, M.; GULATI, S. Mental retardation. **Indian J Pediatr.** v. 70, n. 2, p. 153-158, 2003.
- KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science.** v. 294, p. 1030-1038, 2001.
- KAUFMANN, W.E.; MOSER, H.W. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. **Cereb Cortex.** v.10, p. 981-991, 2000.
- KAUFMANN, R.; STRAUSSBERG, R.; MANDEL, H. *et al.* Infantile cerebral and cerebellar atrophy is associated with a mutation in the MED17 subunit of the transcription preinitiation mediator complex. **Am J Hum Genet.** v. 87, p. 667-670, 2010.
- KHAN, M.A.; RAFIQ, M.A.; NOOR, A. *et al.* Mutation in NSUN2, which encodes an RNA methyltransferase, causes autosomal-recessive intellectual disability. **Am. J. Hum. Genet.** v. 90, p. 856-863, 2012.
- KIMATA, T.; TANIZAWA, Y.; CAN, Y. *et al.* Synaptic Polarity Depends on Phosphatidylinositol Signaling Regulated by myo-Inositol Monophosphatase in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics** v. 191, p. 509-521, 2012.
- KING, R.C.; STANSFIELD, W.D.; MULLIGAN, P.K. **A Dictionary of Genetics.** 7th ed. Oxford: Oxford University Press. 2006.

- LANGOUET, M.; SAADI, A.; RIEUNIER, G. *et al.* Mutation in TTI2 reveals a role for triple T complex in human brain development. **Hum. Mutat.** v. 34, p. 1472-1476, 2013.
- LAW, R.; DIXON-SALAZAR, T.; JERBER, J. *et al.* Biallelic truncating mutations in FMN2, encoding the actin-regulatory protein formin 2, cause nonsyndromic autosomal-recessive intellectual disability. **Am. J. Hum. Genet.** v. 95, p. 721-728, 2014.
- LEAL, A.; HUEHNE, K.; BAUER, F. *et al.* Identification of the variant Ala335Val of MED25 as responsible for CMT2B2: molecular data, functional studies of the SH3 recognition motif and correlation between wild-type MED25 and PMP22 RNA levels in CMT1A animal models. **Neurogenetics** v. 10, p. 275-287, 2009.
- LEONARD, H.; WEN, X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev.** v. 8, p. 117-34, 2002.
- LEWIS, B.A.; REINBERG, D. The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. **J. Cell. Sci.** v. 116, p. 3667-3675, 2003.
- MALIK, S.; ROEDER, R.G. *et al.* Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. **Trends Biochem Sci.** v. 30, n. 5, p. 256-263, 2005.
- MALIK, S.; ROEDER, R.G. *et al.* The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. **Nat. Rev. Genet.** v. 11, p. 761-772, 2010.
- MIR, A.; KAUFMAN, L.; NOOR, A. *et al.* Identification of mutations in TRAPPC9, which encodes the NIK- and IKK-beta-binding protein, in nonsyndromic autosomal-recessive mental retardation. **Am. J. Hum. Genet.** v. 85, p. 909-915, 2009.
- MIR, A.; SRITHARAN, K.; MITTAL, K. *et al.* Truncation of the E3 ubiquitin ligase component FBXO31 causes non-syndromic autosomal recessive intellectual disability in a Pakistani family. **Hum. Genet.** v. 133, p. 975-984, 2014.
- MOCHIDA, G.H.; MAHAJNAH, M.; HILL, A. D. *et al.* A truncating mutation of TRAPPC9 is associated with autosomal-recessive intellectual disability and postnatal microcephaly. **Am. J. Hum. Genet.** v. 85, p. 897-902, 2009.
- MOLINARI, F.; RIO, M.; MESKENAITE, V. *et al.* Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. **Science.** v. 298, p. 1779-1781, 2002.
- MOTAZACKER, M.M.; ROST, B.R.; HUCHO, T. *et al.* A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. **Am. J. Hum. Genet.** v. 81, p. 792-798, 2007.

- MURAKAMI, Y.; TAWAMIE, H.; MAEDA, Y. *et al.* Null mutation in PGAP1 impairing Gpi-anchor maturation in patients with intellectual disability and encephalopathy. **PLoS Genet.** v. 10, e1004320, 2014.
- NAJMABADI, H.; HU, H.; GARSHASBI, M. *et al.* Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. **Nature.** v. 478, p. 57-63, 2011.
- NAKAMURA, Y.; YAMAMOTO, K.; HE X. *et al.* Wwp2 is essential for palatogenesis mediated by the interaction between Sox9 and mediator subunit 25. **Nat. Commun.** v. 2, p. 251, 2011.
- NAPOLI, C.; SESSA, M.; INFANTE, T.; CASAMASSIMI, A. Unraveling framework of the ancestral Mediator complex in human diseases. **Biochimie.** v. 94, n. 3, p. 579-587, 2012.
- NG, S.B.; TURNER, E.H.; ROBERTSON, P.D. *et al.* Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. **Nature.** v. 461, p. 272-276, 2009.
- OMIM. OMIM database. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>>. Acesso em: 01 de maio de 2015.
- OHNISHI, T.; OHBA, H.; SEO, K.C. *et al.* Spatial expression patterns and biochemical properties distinguish a second myo-inositol monophosphatase IMPA2 from IMPA1. **J. Biol. Chem.** v. 282, p. 637-646, 2007.
- OHNISHI, T.; TANIZAWA, Y.; WATANABE, A. *et al.* Human myo-inositol monophosphatase 2 rescues the nematode thermotaxis mutant *ttx-7* more efficiently than IMPA1: functional and evolutionary considerations of the two mammalian myo-inositol monophosphatase genes. **J. Neurochem.** v. 124, p. 685-694, 2013.
- OHNISHI, T.; MURATA, T.; WATANABE, A. *et al.* Defective craniofacial development and brain function in a mouse model for depletion of intracellular inositol synthesis. **J. Biol. Chem.** 2014; v. 289, p. 10785-10796, 2014.
- PHILIPPE, O.; RIO, M.; CARIOUX, A. *et al.* Combination of linkage mapping and microarray-expression analysis identifies NF-kappa-B signaling defect as a cause of autosomal-recessive mental retardation. **Am. J. Hum. Genet.** v. 85, p. 903-908, 2009.
- PUFFENBERGER, E.G.; JINKS, R.N.; SOUGNEZ, C. *et al.* Genetic mapping and exome sequencing identify variants associated with five novel diseases. **PLoS One.** v.7: e28936, 2012.
- RAFIQ, M.A.; KUSS, A.W.; PUETTMANN, L. *et al.* Mutations in the alpha 1,2-mannosidase gene, MAN1B1, cause autosomal-recessive intellectual disability. **Am. J. Hum. Genet.** v. 89, p. 176-182, 2011.

- RANA, R.; SURAPUREDDI, S.; KAM W. *et al.* Med25 is required for RNA polymerase II recruitment to specific promoters, thus regulating xenobiotic and lipid metabolism in human liver. **Mol. Cell Biol.** v. 31, p. 466–481, 2011.
- RAUCH, A.; HOYER, J.; GUTH, S. *et al.* Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. **Am J Med Genet A.** v. 140, p. 2063-2074, 2006.
- REIFF, R.E.; ALI, B.R.; BARON, B. *et al.* METTL23 a transcriptional partner of GABPA, is essential for human cognition. **Hum. Molec. Genet.** v. 23, p. 3456-3466, 2014.
- REUTER, M.S.; MUSANTE, L.; HU, H. *et al.* NDST1 missense mutations in autosomal recessive intellectual disability. **Am. J. Med. Genet.** v. 164^a, p. 2753-2763, 2014.
- RISHEG, H.; GRAHAM., J.M.; CLARK, R.D. *et al.* A recurrent mutation in MED12 leading to R961W causes Opitz-Kaveggia syndrome. **Nature Genet.** v. 39, p. 451-453, 2007.
- ROPER, H.H. Genetics of early onset cognitive impairment. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.** v. 11, p. 161–187, 2010.
- ROPER, F.; DERIVERY, E.; HU, H. *et al.* Identification of a novel candidate gene for non-syndromic autosomal recessive intellectual disability: the WASH complex member SWIP. **Hum. Molec. Genet.** v. 20, p. 2585-2590, 2011.
- RUGGIERO, G.M.; ROSA, M.A.; MELLO, M.F. Mecanismo de ação do lítio: o papel do fosfatidil inositol. **Rev. Neuropsiq. da Infância e Adolescência.** v. 2, n. 3, p. 34-41, 1994.
- RUSCHENDORF, F.; NURNBERG, P. ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10k SNP array data. **Bioinformatics** v. 12, p. 2123-2125, 2005.
- SANTOS, S.; KOK, F.; WELLER, M.; PAIVA, F.R.L.; OTTO, P.A. Inbreeding levels in Northeast Brazil: Strategies for the prospecting of new genetic disorders. **Genet. Mol. Biol.** v. 33, p. 10-16, 2010.
- SANTOS, S.; SILVA, A.A.P; PESSOA, A. *et al.* Increased prevalence of inherited neuromuscular disorders due to endogamy in Northeast Brazil: the need of community genetics services. **J. Community Genetic.** v. 5, p. 199-203, 2013.
- SANTOS, S.; PEQUENO, A.A.; GALVAO, C.R. *et al.* As causas da deficiência física em municípios do nordeste brasileiro e estimativa de custos de serviços especializados. **Ciêns Saúde Colet.** v. 19, p. 559-568, 2014.
- SCHWARTZ, C.E.; TARPEY, P.S.; LUBS, H.A. *et al.* The original Lujan syndrome family has a novel missense mutation (p.N1007S) in the MED12 gene. **J. Med. Genet.** v. 44, p. 472-477, 2007.

- SELA, D.; CONKRIGHT, J.J.; CHEN L. *et al.* Role for human mediator subunit MED25 in recruitment of mediator to promoters by endoplasmic reticulum stress-responsive transcription factor ATF6 α . **J. Biol. Chem.** v. 288, p. 26179-26187, 2013.
- SOUTOURINA, J.; WYDAU, S.; AMBROISE, Y. Boschiero, C. *et al.* Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription in vivo. **Science.** v. 331, p. 1451-1454, 2011.
- SPAETH, J.M.; KIM, N.H.; BOYER, T.G. *et al.* Mediator and human disease. **Semin. Cell. Biol.** v. 22, n. 7, p. 776-787, 2011.
- STRACHAN, T.; READ, A.P. **Genética molecular humana.** 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- STREB, H.; IRVINE, R.F.; BERRIDGE, M.J. *et al.* Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. **Nature.** v. 396, n. 5938, p. 67-69, 1983.
- SWANBERG, S.E.; NAGARAJAN, R.P.; PEDDADA, S. *et al.* Reciprocal co-regulation of EGR2 and MECP2 is disrupted in Rett syndrome and autism. **Hum. Molec. Genet.** v. 18, p. 525-534, 2009.
- THACKRAY, H.M.; TIFFT, C. Fetal alcohol syndrome. **Ped Rev.** v. 22, p. 47-54, 2001.
- TOPPER, S.; OBER, C.; DAS, S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. **Clin. Genet.** v. 80, p. 117-126, 2011.
- TUDOR, M.; MURRAY, P.J.; ONUFRYK C. *et al.* Ubiquitous expression and embryonic requirement for RNA polymerase II coactivator subunit Srb7 in mice. **Genes Dev.** v. 13, p.2365-2368, 1999.
- VERGER, A.; BAERT, J.L.;VERREMAN K. *et al.* The Mediator complex subunit MED25 is targeted by the N-terminal transactivation domain of the PEA3 group members. **Nucleic. Acids. Res.** v. 41, p. 4847-4859, 2013.
- VULTO-VAN SILFHOUT, A.T.; DE VRIES, B.B.; VAN BON. B.W. *et al.* Mutations in MED12 cause X-linked Ohdo syndrome. **Am. J. Med. Genet.** v. 92, p. 401-406, 2013.
- WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P. *et al.* **Biologia Molecular do Gene.** 5ª edição. Artmed, 2006.
- WELLER, M.; TANIERI, M.; PEREIRA, J. C. *et al.* Consanguineous Unions and the Burden of Disability: A Population-Based Study in Communities of Northeastern Brazil. **American J. human biol.** v. 24, p. 835-840, 2012.

ZAHIR, F.; FRIEDMAN, J.M. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility. **Clin Genet.** v. 72, p. 271–287, 2007.

ANEXO

ANEXO - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UEPB



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

COMPROVANTE SISNEP

Andamento do projeto - CAAE - 0359.0.133.000-11

Título do Projeto de Pesquisa				
RETRATO EPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇAS GENÉTICAS E PADRÕES REPRODUTIVOS EM POPULAÇÕES DA PARAÍBA				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	04/07/2011 11:10:57	05/09/2011 14:25:07		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	29/06/2011 10:42:34	Folha de Rosto	FR442854	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	04/07/2011 11:10:57	Folha de Rosto	0359.0.133.000-11	CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	05/09/2011 14:25:07	Folha de Rosto	0359.0.133.000-11	CEP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Prof.ª Dra. Doraciela Pedrosa de Araújo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa