Larissa Fontes

Análise da expressão do gene *FMR1* no ovário

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências, na área de Biologia/Genética.

Orientadora: Angela M. Vianna Morgante
Co-orientadora: Luciana A. Haddad

São Paulo
2011

Larissa Fontes

Análise da expressão do gene *FMR1* no ovário

Analysis of the *FMR1* gene expression in the ovary

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências, na área de Biologia/Genética.

Orientadora: Angela M. Vianna Morgante
Co-orientadora: Luciana A. Haddad

São Paulo
2011

FONTES, LARISSA
Análise da expressão do gene *FMR1* no ovário
95 páginas

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

1. Gene *FMR1* 2. Pré-mutação do *FMR1* 3. Insuficiência ovariana prematura 4. Envelhecimento ovariano

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora:

Angela M. Vianna Morgante
Orientadora

Luciana Amaral Haddad
Co-orientadora

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), concedido à orientadora (Processo nº 1998/14254-2), à co-orientadora (Processo nº 2008/53857-8) e à aluna (Processo nº 2006/06269-8).

Para Vera e Eduardo,
que são meu porto-seguro

Agradecimentos

Este trabalho é o resultado da colaboração de diversas pessoas. Em especial, agradeço:

À minha orientadora, Angela Morgante, pela orientação primorosa, pela oportunidade de realizar este projeto e pelo incentivo.

À Luciana Haddad, co-orientadora deste trabalho, por acompanhar de perto o planejamento, execução e os resultados dos experimentos.

À Dra. Karen Usdin, do NIH, por disponibilizar os camundongos KI para estudo; ao Dr. David Keefe, que disponibilizou as instalações do Laboratory of Reproductive Medicine e do biotério do USF College of Medicine para a realização dos experimentos com camundongos e ao Dr. Peter Pearson, por intermediar essa colaboração.

Aos amigos da USF, Junjiu Huang, Maja Okuka e John Tsibris, pelos ensinamentos, pelo apoio, pela amizade e pela forma como me acolheram. À Rosana, pela maravilhosa recepção e pela imensa ajuda quando eu cheguei à Flórida. Minha convivência com vocês foi simplesmente inesquecível.

A toda equipe da Fertility, especialmente Dr. Edson e Dr. Assumpto, pela colaboração, fornecendo o líquido folicular para obtenção das HGC.

A todos os amigos dos Laboratórios de Genética Humana I e II e do Laboratório de Genômica Funcional e outros, pela amizade, carinho e apoio; por tornar o dia-a-dia alegre e agradável as dificuldades, mais amenas. Vocês são amigos para a vida toda.

À Ligia, pelos ensinamentos e pela ajuda dedicada na cultura das HGC; Silvia, pela importante participação na parte molecular; Rafaella, Juliana e Ana Carla, pelo apoio nos estudos da proteína; Fátima e Mara, por estarem sempre dispostas a me ajudar; Paulo Rogério, pelo apoio técnico; Maraisa, pelo suporte indispensável a esse trabalho; Fernando, Rafaella, Ana Maria e

Bruno, pela ajuda nos estudos com RNA; Déborah e Crys, pela ajuda na cultura e captura de imagens. Carol, pelo apoio na hibridação *in situ* e Adriano, pela formatação e impressão deste trabalho.

À Irina Kerkis, pelas dicas da cultura das HGC. Ao professor Eduardo Gorab e seus alunos Chris e Thiago, pela ajuda nos experimentos de dot-blot e RNA-FISH. Ao professor Luiz Netto e todos os seus alunos e técnicos, pela ajuda e por disponibilizarem o uso de equipamentos e reagentes de seu laboratório. Ao professor Paulo Otto, pela análise estatística.

A James Eberwine e Peter Beckley, por serem solícitos em tirar nossas dúvidas sobre o protocolo de RNA-FISH.

Aos professores Paulo Otto e Maria Rita Passos Bueno, que ocuparam o cargo de Chefe do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva durante a realização deste trabalho, por proporcionarem um ambiente de trabalho agradável.

À minha família e amigos, por estarem sempre ao meu lado e me incentivarem.

Ao meu pai, Toninho, pelo carinho e apoio.

Aos queridos Wilma, Flávio e Onivaldo, por me acolherem e apoiarem como a uma filha.

Ao meu amado GB, por todo o amor e apoio e, principalmente, pela compreensão e ajuda nos momentos finais do doutorado.

À minha querida mãe, Vera, por todo amor, carinho, apoio, incentivo e, principalmente, por ser um exemplo de mãe, filha, amiga, profissional e ser humano.

Índice

CAPÍTULO I

O gene *FMR1* e a insuficiência ovariana 1

I.1. A menopausa precoce 1

I.2. O envelhecimento ovariano 1

I.3. Fatores genéticos relacionados à falha ovariana prematura 3

I.4 O gene *FMR1* 4

I.5. A pré-mutação do gene *FMR1* e FXPOI 7

I.6. A função do gene *FMR1* no ovário 14

I.7. Mecanismos moleculares dos distúrbios associados à pré-mutação do *FMR1* 20

I.8. Este trabalho 26

CAPÍTULO II

A expressão do gene *FMR1* em células ovarianas humanas e murinas 27

II.1. Introdução 27

II.2. Objetivos 28

II.3. Material e Métodos 29

II.4 Resultados e discussão 45

CAPÍTULO III

Estudo do início do desenvolvimento de embriões de fêmeas *knock in* (KI) quanto à pré-mutação do gene *Fmr1* e tentativa de derivação de células tronco embrionárias KI 60

III.1. Introdução 60

III.2. Objetivos 62

III.3. Material e Métodos 62

III.4. Resultados e discussão 66

CAPÍTULO IV

Sumário e Conclusões 76

Abstract 79

Referências Bibliográficas 82

Recursos da Internet 95

CAPÍTULO I

O gene *FMR1* e a insuficiência ovariana

I.1 A menopausa precoce

A menopausa é definida como o término permanente do ciclo menstrual resultante da perda da atividade folículo-ovariana (Paoletti e Wenger, 2003). São consideradas em menopausa natural as mulheres que estão em amenorréia secundária há pelo menos doze meses consecutivos, na ausência de cirurgia, gestação, aleitamento materno ou doença autoimune (*World Health Organization Scientific Group*, 1996). A idade média mundial para menopausa é de 50 anos de idade (Morabia e Constanza 1998) e a distribuição de idades de menopausa, entre 40 e 60 anos, segue aproximadamente uma curva normal (Wood 1989; te Velde e Pearson 2002). Cerca de 1% das mulheres atinge a menopausa antes dos 40 anos de idade. Essa condição é denominada falência ovariana prematura ou menopausa precoce (*Premature Ovarian Failure*, POF; MIM 311360). Um segundo grupo de mulheres (cerca de 10%) tem menopausa cedo (***E**arly **M**enopause*, EM), entre 40 e 45 anos de idade (Coulam e col. 1986; Torgerson e col. 1997), numa das extremidades da curva normal da distribuição de idades de menopausa. Um estudo de mulheres com EM idiopática verificou que 50% dessas mulheres possuíam histórico familial de EM ou POF, sugerindo que essas condições estejam relacionadas e representem a expressão variável de um mesmo distúrbio genético (Tibiletti e col. 1999).

I.2 O envelhecimento ovariano

O envelhecimento ovariano é um processo gradual que culmina com a menopausa. O primeiro evento corresponde ao final da fertilidade; em seguida, ocorre o estabelecimento de ciclos menstruais irregulares até finalmente o término dos ciclos. Estudos em populações nas quais a contracepção é raramente praticada, denominadas populações com fertilidade natural, revelaram que o padrão de declínio da fertilidade com a

idade é universal na espécie humana. A idade média das mulheres ao nascimento do último filho foi de 40-41 anos, marcando, o fim da fertilidade. A menopausa ocorreu, em média, dez anos após o estabelecimento da esterilidade (te Velde e col. 1998 e revisão em te Velde e Pearson 2002).

Esse padrão ocorre porque há um declínio exponencial do número de folículos com a idade da mulher: ao nascimento, as mulheres possuem cerca de um bilhão de folículos e, quando atingem a menopausa, a quantidade de folículos está reduzida a 1000 ou menos; um número insuficiente para sustentar o processo hormonal cíclico da menstruação (Faddy e col. 1992). Regularmente, ao longo da vida, os folículos deixam a reserva de folículos inativos e entram em crescimento, passando por um processo em que respondem diferentemente a fatores que promovem proliferação celular, crescimento e diferenciação; a maioria dos folículos entra em apoptose e poucos atingem a ovulação. Assim, a relação temporal entre a perda do potencial reprodutivo feminino e a redução do *pool* de folículos ovarianos sugere que o regulador dominante do envelhecimento reprodutivo é o ovário (revisão em Tatone e col. 2008).

Com relação aos aspectos moleculares e celulares do envelhecimento do folículo, sua análise requer a consideração de alguns pontos principais: (1) os ovócitos e as células da granulosa de folículos primordiais permanecem em fase de "descanso" por longo tempo e então retomam a atividade mitótica, após 10 a 50 anos; (2) tanto os folículos primordiais quanto aqueles em crescimento ficam expostos a fatores ambientais relacionados ao envelhecimento do compartimento somático do ovário; (3) o desenvolvimento de um ovócito competente depende da comunicação entre todos os compartimentos do ovário. Apesar desses aspectos peculiares, a compreensão dos fatores que causam o envelhecimento do folículo deve ser colocada no contexto das teorias sobre mecanismos de envelhecimento baseadas em estudos de outros tecidos e órgãos, que não o ovário. Embora seja aceito que o envelhecimento é resultado da interação entre fatores genéticos e ambientais, a maioria das teorias do envelhecimento é baseada no conceito de que o mau funcionamento fisiológico relacionado à idade resulta do acúmulo de danos irreparáveis em biomoléculas, como efeito colateral inevitável do metabolismo normal. Nesse contexto, a teoria mais relevante para o envelhecimento ovariano – e consequentemente do folículo - é focada na redução da capacidade de ovócitos e células da granulosa para neutralizar

espécies reativas de oxigênio (ROS, ***R**eactive **O**xygen **S**pecies*,), que estão entre os indutores fisiológicos de dano celular mais importantes, associados com o envelhecimento (revisão em Tatone e col. 2008).

As ROS modulam funções fisiológicas reprodutivas como maturação do ovócito, esteroidogênese ovariana, função do corpo lúteo e luteólise. Para a manutenção de níveis fisiológicos de ROS em todas as fases foliculares, ovócitos e células da granulosa produzem as principais enzimas antioxidantes e desintoxicantes. Vários estudos em modelos animais e humanos sugerem que os folículos primordiais e periovulatórios sofrem estresse oxidativo relacionado com a idade e depleção das defesas enzimáticas antioxidantes (revisão em Tatone e col. 2008).

I.3 Fatores genéticos relacionados à falha ovariana prematura

A identificação do histórico familiar como fator preditivo da idade de menopausa (Cramer e col. 1995) indica a participação de fatores genéticos nesse processo. Em casos de POF familial, já foram descritos padrões de herança autossômica dominante (Davis e col. 2000) e recessiva (Aittomaki 1994, Meyers e col. 1996, Davis e col. 2000) e dominante ligada ao X (van Kasteren e col. 1999).

Alterações estruturais do cromossomo X estão frequentemente associadas à POF, como deleções (Skibsted e col. 1984, Eggermann e col. 2005, Fimiani e col. 2006) e translocações X;autossomo (revisão em Schlessinger e col. 2002). Com base nesses dados, foram delimitadas duas regiões do cromossomo X como críticas para o funcionamento ovariano normal, Xq13.3-q21.1 e Xq26-28, denominadas POF1 e POF2, respectivamente. Foi postulado que a ausência de genes contidos nessas regiões ou alterações na sua expressão podem estar associadas a EM e POF. Além disso, foi observado desvio da razão sexual em irmandades com recorrência de POF e o excesso de mulheres foi interpretado como decorrente de alterações do cromossomo X que contribuem para a determinação de POF e EM e que seriam letais em hemizigose nos homens (Cramer e col. 1995; Davis e col. 2000).

Com base no mapeamento de 25 pontos de quebra no braço longo do cromossomo X em translocações associadas a POF e em casos da literatura, Rizzolio e col. (2006)

sugeriram que, além da interrupção de genes sensíveis à dosagem no cromossomo X, outro mecanismo que poderia contribuir para POF seria o efeito de posição sobre genes que flanqueiam os pontos de quebra, tanto na região crítica do cromossomo X quanto nos autossomos.

A POF é também característica de algumas síndromes. A síndrome de blefarofimose familial do tipo I (***B****lepharophimosis*, ***P****tosis, and* ***E****picanthus inversus* ***S****yndrome*, BPES; MIM 110100), com padrão de herança autossômica dominante, é um exemplo (Zlotogora e col. 1983); outro exemplo são as mutações de ponto que inativam o receptor de hormônio folículo estimulante (***F****ollicle-****S****timulating* ***H****ormone* ***R****eceptor*, FSHR; MIM 136435), causando disgenesia ovariana hipergonadotrópica, que tem herança autossômica recessiva (Aittomaki e col. 1995).

A pré-mutação do gene *FMR1* (***F****ragile X* ***M****ental* ***R****etardation* ***1***; MIM 309550), entretanto, é a causa mendeliana mais freqüente de POF, com herança dominante ligada ao X e penetrância incompleta (Allingham-Hawkins e col. 1999).

I.4 O gene *FMR1*

O gene *FMR1*, mapeado em Xq27.3 (na região POF2), quando mutado, tornando-se não funcional, causa a síndrome do cromossomo X frágil (MIM 309550), que representa a segunda causa genética mais freqüente de deficiência intelectual, atrás apenas da síndrome de Down. É responsável por cerca de 25% da deficiência intelectual de herança ligada ao X e tem prevalência estimada de 1:4.000-6.000 no sexo masculino e 1:8.000-9.000, no sexo feminino (Crawford e col. 2001).

Na região 5' não traduzida (***5´*** ***U****n****T****ranslated* ***R****egion*, 5´UTR) do gene *FMR1* há uma repetição $(CGG)_n$, polimórfica na população geral (6 a ~54 trincas). A expansão do número de trincas para mais de 200 está associada à metilação de citosinas das repetições e da ilha CpG adjacente, levando ao silenciamento transcricional do gene *FMR1,* o que caracteriza a mutação completa (Fu e col. 1991; Oberlé e col. 1991, Verkerk e col. 1991, Yu e col. 1991). A inativação do gene *FMR1*resulta na manifestação da síndrome do X frágil devido à ausência de seu produto, a proteína FMRP (***F****ragile X* ***M****ental* ***R****etardation* ***P****rotein*) (Verheij e col. 1993).

Quando os alelos do gene *FMR1* têm expansões com um número de trincas entre os alelos normais e aqueles da mutação completa, são denominados de pré-mutações (~55 a ~200 trincas). Caracterizam-se por se expandirem quando transmitidos à prole, especialmente via materna, permanecendo ainda na faixa de pré-mutação ou atingindo o número de trincas de uma mutação completa. O menor alelo pré-mutado que foi documentado, expandindo para uma mutação completa numa geração, tinha 59 trincas (Nolin et al. 2003). Existe ainda uma zona intermediária (ou *gray zone*), de alelos potencialmente instáveis, que podem expandir-se para mutação completa em algumas gerações. Alguns pesquisadores consideram que a repetição dos alelos dessa zona intermediária contém 41 a 54 trincas (Morris e col. 1995); outros, 45 a 54 (Witterberger e col. 2007). Já o American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) classifica os alelos do *FMR1* com $(CGG)_{41\text{-}60}$ como intermediários (ACOG Committee Opinion, 2006).

Apesar de não haver um limite claro, as classes de alelos compreendem alelos estáveis (os normais), intermediários (que podem ou não ser instáveis), as pré-mutações (instáveis) e as mutações completas (instáveis e metiladas). A capacidade de expansão da repetição CGG depende, além do tamanho, da estrutura da repetição: a presença de interrupções da repetição CGG por trincas AGG é um fator que contribui para sua estabilidade (Kunst e col. 1997).

Quanto à função do produto do gene *FMR*, a FMRP, os dados da literatura apontam para sua participação em mecanismos de transporte de mRNA do núcleo para o citoplasma, onde a proteína modula a tradução de seus RNAs-alvo, interagindo com componentes da via de microRNA e da maquinaria de tradução da célula, os polirribossomos.

A função da FMRP reside primariamente na sua habilidade de ligação a RNA, demonstrada experimentalmente para o domínio caixa-RGG (arginina-glicina-glicina) em sua região C-terminal (Brown e col. 2001, Darnell e col. 2001). O domínio KH (homologia à ribonucleoproteína heterogênea nuclear K), descrito em outras proteínas por sua ligação a RNA, está presente em duas cópias na região central da FMRP caracterizados pela ligação a RNA *in vitro* (Darnell e col. 2005, 2009). A FMRP tem sinais de localização e exportação nuclear, NLS e NES, respectivamente, que lhe permitem transitar entre o núcleo e o citoplasma. Ensaios de imunofluorescência, entretanto, detectam a FMRP essencialmente no citoplasma (Castrén e col. 2001, Mazroui e col. 2002).

A FMRP está presente em complexos ribonucleoprotéicos, contendo RNA poliadenilado, associados à maquinaria de tradução. Em todos os tipos celulares estudados, a maioria da FMRP foi detectada em sedimentos pesados de polirribossomos, aos quais se associam cadeias em crescimento de polipeptídeos recém-sintetizados. Devido a essa localização celular específica, inferiu-se que a FMRP atua na tradução de mRNA (revisão em Bardoni e col. 2006).

Em neurônios glutamatérgicos, a FMRP liga-se a RNA e atua como supressor ou ativador de tradução de mRNA dendríticos (Zalfa e Bagni, 2004, Bechara e col. 2009). Em células STEK nocaute (KO) quanto ao *Fmr1*, isoladas de embriões de camundongos, a cotransfecção de *Fmr1* e genes repórteres resultou na queda brusca dos níveis dos produtos dos repórteres com o aumento da FMRP, apesar da manutenção dos níveis de seus respectivos mRNA, indicando que a FMRP modula negativamente a tradução desses transgenes. Nessas células, tanto na condição de superexpressão da FMRP transgênica quanto em situação de estresse induzido por calor, foi demonstrado que a FMRP transfectada fica acumulada em *foci* citoplasmáticos, juntamente com mRNA contendo cauda poli-A e outras proteínas de ligação a mRNA; esses *foci* são os grânulos de estresse, formados por acúmulo da proteína e de mRNA não traduzidos, quando as células são submetidas a uma variedade de estresses ambientais, levando à parada da tradução (Mazroui e col. 2002).

Em cultura primária de neurônios de hipocampo de embriões de camundongos, mostrou-se que a FMRP modula positivamente a tradução de um mRNA-alvo, o da superoxido dismutase 1 (*Sod1*), por meio de uma estrutura de RNA organizada em três alças denominada SoSLIP (***So****d1* ***S****tem* ***L****oop* ***I****nteracting with FMR****P***), que funciona como um *enhancer* traducional dependente de FMRP, e de um sítio interno de ligação com o ribossomo, de forma independente de FMRP. Na ausência da FMRP, os níveis do mRNA de *Sod1* nos polirribossomos estão reduzidos e Sod1 é menos expressa no cérebro e em linhagens celulares de camundongos nocaute quanto ao *FMR1*, sugerindo que a expressão da proteína é positivamente modulada pela interação entre SoSLIP e a FMRP (Bechara e col. 2009).

Foi demonstrado que a regulação da tradução de mRNA pela FMRP é realizada por meio da via de microRNA. Em drosófila, observou-se que a proteína faz parte do complexo

de silenciamento induzido por RNA (***R**NA **I**nduced **S**ilencing **C**omplex*, RISC), associando-se a seus componentes Dicer, Argonaute 1 e 2 (Ago1 e 2) e miRNA. Já em mamíferos, a FMRP associa-se a Dicer, Ago2, miRNA e outros componentes da via (revisão em Li e col. 2008).

Além das evidências bioquímicas, estudos funcionais em drosófila corroboram a interação entre a proteína dFmrp e componentes da via de miRNA. Verificou-se, por exemplo, que Ago1 é fundamental para a função biológica da dFmrp no desenvolvimento neural e na sinaptogênese (revisão em Li e col. 2008). Mais exemplos da interação entre dFmrp e a via de miRNA estão relatados no item I.6.

Nota: o símbolo oficial do ortólogo do *FMR1* em drosófila é *Fmr1* (FlyBase FBgn0028734), porém muitos artigos atualmente designam o gene como *dFmr1* para distingui-lo do ortólogo de camundongo; assim, adotaremos neste trabalho o símbolo *dFmr1* para o gene e dFmrp para a proteína.

I.5 A pré-mutação do gene *FMR1* e FXPOI

A partir da década de 1990, os alelos pré-mutados do gene *FMR1* passaram a ter importância clínica reconhecida, quando se descobriu sua associação com POF (Schwartz e col. 1994, Vianna-Morgante e col. 1996; Allingham-Hawkins e col. 1999). Mais recentemente, uma doença neurodegenerativa caracterizada por tremor e ataxia, a FXTAS (***F**ragile-**X** associated **T**remor/**A**taxia **S**yndrome*) foi descrita em portadores de alelos pré-mutados, principalmente homens após os 50 anos de idade (Hagerman e col. 2001, Hagerman e Hagerman 2004).

Como o termo POI (***P**rimary **O**varian **I**nsufficiency*) denota o processo resultante da diminuição do número de folículos primordiais, seja devido ao aumento de apoptose, à perda dos folículos ou à falha dos folículos em responderem à estimulação pelas gonadotrofinas (revisão em Welt 2008), os distúrbios ovarianos associados à pré-mutação passaram a ser designados como “insuficiência ovariana primária associada ao X Frágil” (FXPOI, ***F**ragile-**X** associated **P**rimaray **O**varian **I**nsufficiency*).

Estima-se que a pré-mutação do gene *FMR1* esteja presente em uma em cada 259 mulheres da população em geral (Rousseau e col. 1995). De acordo com um estudo

colaborativo internacional em portadoras da pré-mutação do gene *FMR1*, a incidência de FXPOI entre mulheres pré-mutadas é de 24% (Allingham-Hawkins e col. 1999). Entre mulheres com FXPOI esporádica, a frequência da pré-mutação é de 3% a 4% e, nas famílias com recorrência de POF, 12,5% a 16% das mulheres são pré-mutadas (Murray e col. 1998, Costa e col. 2006).

Buscando por fatores determinantes de FXPOI entre as mulheres pré-mutadas, uma série de características foi comparada entre mulheres normais e pré-mutadas, com ou sem FXPOI. Alguns trabalhos analisaram características genéticas, como haplótipos de marcadores, herança paterna ou materna e número de repetições CGG. Além disso, os níveis de expressão do mRNA e da proteína do gene *FMR1* no sangue de mulheres com repetições CGG em diversos intervalos de tamanho foram analisados em relação a indicadores de reserva ovariana.

Mulheres portadoras da pré-mutação, que não tiveram FXPOI têm em média menopausa mais cedo do que suas irmãs não portadoras (Vianna-Morgante e col. 1999) e, entre aquelas que ainda não entraram em menopausa, 25% apresentam disfunção ovariana subclínica que leva ao aumento dos níveis de FSH antes dos 40 anos de idade (Murray e col. 1999).

A FXPOI parece agrupar-se em algumas famílias (Vianna-Morgante e col. 1996), enquanto em outras, nenhuma das portadoras de pré-mutação sofre POI. Costa e col. (2006) analisaram os marcadores DXS548 e FRAXAC1, ligados à repetição CGG do *FMR1*, investigando se determinados haplótipos estavam preferencialmente ligados à pré-mutação associada à POI. Verificaram que as mulheres com FXPOI não constituíam um subgrupo, pois os haplótipos encontrados foram aqueles comumente associados a mutações do gene *FMR1*.

Hundscheid e col. (2000) observaram uma relação estreita entre a herança da mutação via paterna e a manifestação de FXPOI em mulheres holandesas. Essa associação, entretanto, não foi verificada em mulheres portadoras de pré-mutação, brasileiras (Costa e Vianna-Morgante, 2000) e inglesas (Murray e col. 2000).

A relação entre o tamanho das repetições $(CGG)_n$ e a frequência de FXPOI não é linear. O maior risco para POI ou a manifestação da menopausa mais cedo está no grupo com alelos com $(CGG)_{80\text{-}99}$, quando comparado aos grupos de mulheres não portadoras da

pré-mutação e de portadoras de alelos com $(CGG)_{59-79}$ e $(CGG)_{>100}$ (Ennis e col. 2006). Um estudo posterior, utilizando amostragem maior, confirmou essa associação não linear entre o tamanho da expansão da repetição $(CGG)_n$ e a ocorrência de POI, acrescentando que as portadoras de pré-mutação com $(CGG)_{80-99}$ são também mais suscetíveis à osteoporose (Allen e col. 2007); além disso, foram propostas duas hipóteses de etiologia molecular para explicar a associação mais fraca entre POI e as expansões maiores. Uma delas postula que o efeito pré-mutação ocorre durante o desenvolvimento pré-natal do *pool* de ovócitos, reduzindo a quantidade de gametas. Essa hipótese é baseada no fato de a expressão da FMRP ser alta nas células germinativas dos ovários fetais durante a fase de proliferação das ovogônias e na proposição dos autores de que o aumento nos níveis de mRNA do *FMR1* resultaria em um aumento na produção da FMRP na faixa de $(CGG)_{80-99}$; assim, uma vez que a proteína inibe a tradução de mRNA, ocorreria haploinsuficiência de transcritos cuja tradução é suprimida pela FMRP. Por outro lado, a ineficiência na tradução da FMRP seria restrita aos alelos com $(CGG)_{>100}$. Já a segunda hipótese propõe que a repetição $(CGG)_{>100}$ no mRNA tem um efeito tóxico ao longo do tempo, levando ao aumento da taxa de atresia folicular mais tarde, na vida reprodutiva da mulher, de forma análoga ao mecanismo de ganho de função proposto para o outro transtorno associado à pré-mutação, a FXTAS. O transcrito do *FMR1* é expresso no adulto somente durante a maturação dos folículos e não em estágios iniciais. Assim, para explicar a associação não linear entre tamanho da repetição CGG e POI, os autores admitiram que o transcrito com $(CGG)_{>100}$ pode assumir conformação ou comportamento diferente daqueles com $(CGG)_{59-99}$, como já haviam postulado em trabalho anterior (Sullivan e col. 2005).

Foi relatada uma maior incidência de gêmeos dizigóticos na prole de mulheres portadoras de pré-mutação, quando comparadas à população geral (Turner e col. 1994, Mila e Mallolas 2001); já um estudo brasileiro não encontrou diferença estatisticamente significativa entre as proles de mulheres portadoras de pré-mutação e de mães de crianças com deficiência mental não específica; uma maior freqüência de gêmeos dizigóticos foi, entretanto, observada na prole de portadoras de pré-mutação que apresentaram FXPOI (Vianna-Morgante, 1999). Allen e col. (2007) encontraram aumento dessa frequência entre as mulheres portadoras de alelos com $(CGG)_{80-99}$. É sabido que o aumento da probabilidade de nascimento de gêmeos aumenta com a idade materna até a idade de 35-39 anos, o que é

atribuído ao aumento nos níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH). O incremento precoce dos níveis de hormônio folículo-estimulante observado em mulheres portadoras de pré-mutação (Black e col., 1995) aumentaria a chance de gêmeos dizigóticos na prole de mulheres mais jovens (Partington e col. 1996). As mulheres que apresentaram FXPOI teriam assim maior probabilidade de ter filhos gêmeos (Vianna-Morgante, 1999).

A análise da idade à menopausa (NMA, *Normal Menopausal Age*) na presença do efeito da pré-mutação do *FMR1*, quando ajustada para os efeitos do tamanho da repetição CGG e de fatores complicadores, incluindo tabagismo e índice de massa corporal (IMC), confirmou a associação entre o tamanho da $(CGG)_n$ e a NMA (Hunter e col. 2008). Abordando essas variáveis juntamente com efeitos genéticos residuais, foi estimado que esse último componente adicionou uma variância de 0,55 (p=0,022) e, quando o tamanho da repetição (CGG) foi analisado como uma variável categórica (intervalos de número de trincas CGG de 59-79, 80-99 e 100-200), os efeitos genéticos residuais adicionaram uma variância de 0,64 (p=0,004), confirmando assim sua influência sobre a NMA.

Um estudo com 18 famílias brasileiras que apresentavam irmãs portadoras e não portadoras da pré-mutação do *FMR1*, todas pós-menopausa, a pré-mutação claramente reduzia a NMA das portadoras em relação às suas irmãs normais, porém a verdadeira contribuição na variação da NMA pela pré-mutação do *FMR1* só surgiu quando a NMA das portadoras foi comparada com a de suas irmãs normais, e não quando o grupo de portadoras foi comparado a um grupo não aparentado de não portadoras; assim, os autores concluíram que o *background* genético familiar foi um fator determinante de variância da NMA associado à pré-mutação (Pearson e col. 2010).

Os relatos na literatura sobre a influência do tamanho da repetição $(CGG)_{n,}$ na faixa normal – intermediária, sobre a função ovariana não são concordantes. Em uma amostra de 366 mulheres com POI, não foi encontrada diferença significativa na frequência de alelos do *FMR1* com $(CGG)_{35\text{-}58}$, em comparação com o grupo controle, constituído de mulheres com função ovariana normal (Bennett e col. 2010). A análise do efeito do tamanho da repetição CGG na disfunção ovariana mostrou que o risco de POI apenas aumentou ligeiramente entre as mulheres com $(CGG)_{40\text{-}79}$, o que não foi estatisticamente significativo (Sullivan e col. 2005). Assim, não haveria aumento significativo na ocorrência de alelos intermediários do *FMR1* em amostras de mulheres com POI. Por outro lado, alguns

trabalhos mostraram que, em amostras de mulheres com atividade ovariana normal, há maior frequência de alelos com repetição $(CGG)_{30-36}$, em comparação com mulheres que apresentam POI (Gleicher e col. 2009, Fiçicioglu e col. 2010); estas últimas, por sua vez, têm maior frequência de alelos com repetições $(CGG)_{35-54}$ (Bretherick e col. 2005), ou $(CGG)_{41-58}$ (Bodega e col. 2006). Assim, nesses trabalhos, os autores sugerem que o tamanho da repetição CGG de alelos do *FMR1* considerados normais ou intermediários (ACOG Committee Opinion, 2006) estejam relacionados com a diminuição da reserva ovariana e aumento da frequência da POI.

As diferentes definições de tamanho da repetição CGG nos alelos do *FMR1* que os incluem nas classes de alelos normais, intermediários ou pré-mutados, como mostrado acima, e os diversos parâmetros para detecção de disfunção ovariana dificultam as comparações dos resultados entre os trabalhos. Consequentemente, o limite inferior do tamanho da repetição CGG do *FMR1* que afeta a função ovariana permanece indefinido.

Alguns trabalhos buscaram associações entre o número de repetições CGG e diversos indicadores de função ovariana. Bibi e col. (2010) investigaram a relação entre a resposta ovariana e o número de trincas das repetições CGG entre mulheres portadoras da pré-mutação nas faixas de $(CGG)_{<100}$ e $(CGG)_{\geq 100}$ submetidas a ciclos de hiperestimulação ovariana controlada, para fertilização *in vitro* e diagnóstico pré-implantacional. Detectaram correlação positiva entre o tamanho das repetições CGG e marcadores de resposta ovariana, como níveis mais altos de estradiol (E2) no dia da administração de hCG e maior número de ovócitos coletados e de zigotos com dois pronúcleos, em mulheres com repetições $(CGG)_{\geq 100}$. Já a correlação entre o tamanho das repetições CGG e a dose de rFSH a ser aplicada no ciclo foi significativamente negativa, sendo necessárias doses menores para as portadoras das repetições maiores; assim os autores concluíram que são as portadoras de pré-mutações com repetições $(CGG)_{<100}$ que sofrem de deficiência na resposta ovariana e diminuição da taxa de fertilização. Entretanto, essa diferença na resposta ovariana não estava correlacionada com os níveis basais de FSH, que estavam dentro da normalidade nos dois grupos.

Um outro estudo analisou a relação entre o tamanho das repetições $(CGG)_n$ em ambos os alelos do gene *FMR1* e a reserva ovariana, avaliando o tamanho das repetições, a idade e os níveis do hormônio anti-Mülleriano (AMH), que estão positivamente

correlacionados com a reserva ovariana. Foram determinados os níveis do hormômio em 34 doadoras de ovócitos, com idades até 34 anos (grupo controle), e 305 pacientes de uma clínica de infertilidade, com idade abaixo de 38 anos. Considerando as mulheres com ambos os alelos do *FMR1* com $(CGG)_{26-34}$ como "normais", as portadoras de um alelo nessa faixa e outro com repetição maior ou menor do que $(CGG)_{26-34}$ como "heterozigotas" e aquelas com ambos os alelos fora dessa faixa, como "homozigotas", as mulheres do grupo de doadoras de óvulos não diferiram quanto aos níveis de AMH entre si, independentemente de terem ambos os alelos "normais", serem "heterozigotas" ou "homozigotas"; já entre as pacientes inférteis abaixo dos 38 anos, enquanto as "heterozigotas" tinham níveis de AMH que não diferiam daqueles das mulheres consideradas "normais", as "homozigotas" apresentaram níveis do hormônio significativamente reduzidos. Por outro lado, ao redor dos 35 anos, as mulheres "heterozigotas" tinham níveis de AMH mais altos do que as mulheres "normais", enquanto nas "homozigotas", os níveis excederam levemente aos das mulheres normais. Os autores sugeriram que o gene *FMR1* participa do controle da reserva ovariana, uma vez que as "heterozigotas" e as "homozigotas" quanto à repetição CGG manifestavam sinais de reserva ovariana reduzida (Gleicher e col. 2011). Esse estudo comparou amostras de mulheres com diferentes médias de idade e número amostral. O fato de os níveis de AMH não diferirem entre as doadoras de ovócitos com genótipo "normal", "heterozigoto" ou "homozigoto" indica que não há diferença, do ponto de vista biológico, entre as portadoras dos diferentes alelos.

Com base em dois trabalhos, sendo um deles o estudo preliminar mostrando correlação entre os níveis de AMH e o declínio precoce da reserva ovariana nas portadoras da pré-mutação do *FMR1* (Rohr e col. 2008) e o outro, a descrição de um modelo para prever menopausa baseado nos níveis de AMH, que foi consistente entre as idades à menopausa previstas e reais entre mulheres naturalmente férteis (Tehrani et al. 2010), Spath e col. (2011) formularam a hipótese de que o declínio do AMH é estável em portadoras da pré-mutação. Para testá-la, determinaram os níveis do AMH ao longo do tempo, em amostras de sangue de 41 mulheres de famílias X frágil, das quais 12 eram portadoras de pré-mutação e 29, não-portadoras, com idade entre 18 e 55 anos; avaliaram os efeitos da idade e do genótipo nos níveis do AMH e verificaram que, em todas as idades, as pré-

mutadas apresentaram níveis mais baixos AMH. Para todas as mulheres, os níveis do AMH diminuíram em cerca de 10% por ano, porém o efeito adicional da pré-mutação foi a diminuição dos níveis do AMH em 54%, nas portadoras. O desvio do nível de AMH mostrou correlação intra-individual, e os autores concluíram que o estudo longitudinal do AMH permite avaliar a reserva ovariana antes do estabelecimento do envelhecimento ovariano prematuro e, assim, prever o estabelecimento da FXPOI (Spath e col. 2011).

A prevalência de doenças autoimunes, incluindo lúpus, esclerose múltipla, fibromialgia (com um componente autoimune postulado) e doença autoimune da tireóide, está aumentada em mulheres com a pré-mutação do *FMR1* (Coffey e col. 2008, Greco e col. 2008; Rodriguez-Revenga e col. 2009; Zhang e col. 2009). Os transtornos autoimunes em algumas portadoras da pré-mutação estariam relacionados à toxicidade relacionada a níveis elevados do mRNA do *FMR1* (Coffey e col. 2008, Greco e col. 2008, Zhang e col. 2009). Por outro lado, há evidências de que a doença autoimune da tireóide pode levar à POI (revisão em Cervera e Balasch 2008). Recentemente, numa amostra composta por mulheres não portadoras de pré-mutação do *FMR1*, sendo nove delas com POI (FSH sérico > 50 IU/ml), 30 com envelhecimento ovariano precoce (POA, *Premature Ovarian Aging*; FSH entre 12 e 49 IU/ml) e 40 com atividade ovariana normal, Fiçicioglu e col. (2010) mostraram que três das mulheres com POI tinham anticorpos anti-tireóide (Fiçicioglu e col. 2010). Assim, foi levantada a hipótese de que a FXPOI poderia ser consequência de problemas autoimunes nas portadoras da pré-mutação, porém estudos mais detalhados são necessários para verificar essa associação.

Com relação ao padrão de inativação do cromossomo X nas mulheres, o estudo de pares de irmãs portadoras de expansões CGG de tamanhos semelhantes e discordantes quanto ao fenótipo de FXPOI mostrou correlação positiva entre a porcentagem de alelos intermediários ou pré-mutados ativos e a ocorrência de FXPOI: as mulheres com FXPOI apresentavam uma proporção de alelos intermediários ou pré-mutados ativos pelo menos duas vezes maior do que suas irmãs portadoras que não apresentaram FXPOI (Bodega e col. 2006). Já num estudo realizado por nosso grupo de pesquisa em mulheres pré-mutadas não aparentadas, a proporção do alelo pré-mutado ativo em linfócitos do sangue periférico não diferiu significativamente entre as mulheres que tiveram e as que não tiveram POI (Costa e col. 2006); resultados semelhantes foram obtidos em um estudo mais recente

(Spath e col. 2010). Os autores, entretanto, não descartaram a possibilidade da influência do padrão de inativação do cromossomo X na manifestação de FXPOI, uma vez que esse padrão pode diferir entre os ovários e o sangue periférico, tecido que foi estudado.

No caso da FXTAS, os homens são predominantemente afetados e a influência do padrão de inativação do cromossomo X aparece como um fator contribuindo para a diferença da manifestação entre os sexos. Esse foi o fator sugerido para a variação na gravidade dos sintomas da FXTAS entre irmãs, já tendo sido relatados sintomas mais graves da doença em mulheres portadoras do alelo pré-mutado predominantemente ativo (Berry-Kravis e col. 2005).

I.6 A função do gene *FMR1* no ovário

A FMRP tem expressão ubíqua, mas é encontrada em mais altas concentrações no cérebro, ovários e testículos de indivíduos normais (Bachner e col. 1993, Hinds e col. 1993). A expressão no desenvolvimento dos ovários e testículos indica que a FMRP deve influenciar o funcionamento gonadal (Bachner e col. 1993).

Rife e col. (2004) compararam o padrão de expressão da FMRP no córtex cerebral, no útero e nos ovários entre dois fetos humanos do sexo feminino, um normal e outro portador de mutação completa. A proteína estava presente nos tecidos de ambos os fetos, porém em níveis e padrões diferentes. O córtex cerebral do feto controle apresentou FMRP em quase todas as células da placa cortical em desenvolvimento, enquanto o feto mutado apresentava a proteína em cerca de 50% das células corticais, num mosaico, de acordo com o esperado, considerando o padrão casual da inativação de um dos cromossomos X. Nos ovários de ambos os fetos, a FMRP foi encontrada em todas as células germinativas, envoltas por células da paragranulosa e intersticiais, que não expressavam a proteína. No feto portador da mutação, a expressão da FMRP em todas as células germinativas se explica, porque ambos os cromossomos X estão ativos nas células germinativas. O epitélio Mulleriano das trompas de Falópio do feto controle expressava a FMRP de forma contínua, enquanto o portador da mutação completa mostrou padrão de expressão em mosaico.

A análise da expressão do *Fmr1* em camundongos, por hibridação *in situ* de RNA, mostrou que o gene é transcrito de forma ubíqua durante o desenvolvimento, havendo

concentração mais alta do mRNA nos testículos e ovários. Nos testículos, imaturos e maduros, as espermatogônias do tipo A1 expressam *Fmr1,* sendo a expressão mais alta no testículo imaturo, declinando no início da vida adulta. No ovário fetal, a expressão é alta no estágio em que ocorre a proliferação das ovogônias; já no ovário maduro, não foi encontrado sinal de hibridação mais acentado em nenhum tipo celular específico (Bachner e col. 1993).

Um estudo amplo da localização da Fmrp em camundongos (Bakker e col. 2000) revelou distribuição ubíqua, porém particularmente significativa no cérebro, músculo esquelético, testículos e ovários; nestes, a Fmrp estava presente no citoplasma do óvulo, na zona pelúcida, na região antral e nas células da granulosa dos folículos em crescimento. Nos testículos, a expressão da Fmrp foi estudada no período neonatal, quando ainda estão em desenvolvimento, e também no adulto. Três dias após o nascimento, a Fmrp era abundante no citoplasma das células germinativas primordiais e em menor quantidade no citoplasma das células de Sertoli e das células intersticiais; no dia 7 após o nascimento, o padrão de expressão foi similar. No décimo quarto dia, as células de Sertoli praticamente não possuíam Fmrp, já as espermatogônias, que se haviam diferenciado a partir das células primordiais, exibiram a Fmrp no citoplasma. Nos testículos dos camundongos adultos, a Fmrp estava localizada no citoplasma das espermatogônias e dos espermatócitos primários recém-formados.

Um modelo de camundongo transgênico foi produzido para investigar a expressão do *FMR1*, usando um gene de fusão *FMR1*/lacZ, que consistia em um gene repórter de β-galactosidase de *E. coli* ligado a um fragmento de 2.8 kb que continha a região 5' do *FMR1*. O estudo revelou a presença da proteína de fusão na crista genital do embrião e, em fêmeas adultas, em células da granulosa de folículos imaturos (Hergersberg e col. 1995).

A coloração imunoistoquímica em três amostras de cortes histológicos de ovários humanos, coletados de mulheres com diagnóstico de cisto ovariano, com idade de cinco meses, 10 e 19 anos, revelou que a FMRP está presente nas células da granulosa, mas não nos ovócitos, de folículos imaturos (Schuettler e col. 2011).

Em conjunto, os dados referentes à expressão do transcrito e da proteína em ovários de camundongos e humanos indicam que o gene *FMR1* deva participar no processo de proliferação das células germinativas e, após o nascimento, parece ficar restrito às células

da granulosa, permanecendo inativo ou com expressão basal até o recrutamento dos folículos, quando passa novamente a ter expressão significativa nos ovócitos.

O modelo animal que mais contribuiu para a compreensão da função do gene *FMR1* no ovário foi o da drosófila. Os ovários da drosófila são compostos de 12-16 ovaríolos, cada um contendo uma estrutura anterior chamada germário, seguida por uma série de câmaras ovocitárias que se desenvolvem em uma seqüência bem caracterizada, até a etapa 14, na qual o ovócito está totalmente maduro, pronto para a fertilização. As câmaras ovocitárias emergem da região posterior do germário como cistos individuais de 16 células germinativas que estão envolvidas por uma monocamada de células foliculares somáticas (Figura I.1). Cada cisto de 16 células germinativas surge de quatro divisões sincronizadas de um único cistoblasto e consiste em 15 células nutridoras, que fornecem alimento para a 16ª célula germinativa, o ovócito em desenvolvimento (Spradling e col. 1997 *apud* Epstein e col. 2009). Assim, a oogênese na drosófila é um sistema estabelecido para estudos de proliferação, diferenciação e sinalização celular durante o desenvolvimento.

O ortólogo do *FMR1* em drosófila é reponsável pela síntese da dFmrp, proteína presente nas células-tronco e cistoblastos, na extremidade do germário, assim como nos cistos em divisão. Em fêmeas nocaute quanto ao *dFmr1*, a oogênese é anormal: as câmaras ovocitárias apresentam número de células germinativas reduzido ou aumentado, ocorrem ovócitos poliplóides ou dois ovócitos por câmara, localizados em pólos opostos (Costa e col. 2005; Epstein e col. 2009); pode ocorrer menor número ou ausência de câmaras ovocitárias no germário (Yang e col. 2007).

A proteína dFmrp, no germário, colocaliza-se com o mRNA de *orb,* que codifica a proteína citoplasmática de ligação ao elemento de poliadenilação, e regula negativamente sua tradução. A proteína orb é um ativador traducional necessário à especificação da linhagem germinativa feminina e à formação dos eixos anteroposterior e dorsoventral do embrião (Costa e col. 2005). A ação inibitória da dFmrp sobre orb é seletiva, pois somente alguns dos alvos de orb são inibidos; assim, concluiu-se que os genes *dFmr1* e *orb* desempenham papel importante na formação dos cistos e na especificação do ovócito. Por outro lado, mutantes de drosófila que não expressam a dFmrp apresentam defeitos embrionários nos primeiros ciclos rápidos de divisão nuclear que antecedem a grastrulação, na migração nuclear e na formação das células do pólo posterior, efeitos que independem

de orb, mas relacionam-se ao posicionamento da dFmrp no germário (Deshpande e col. 2006).

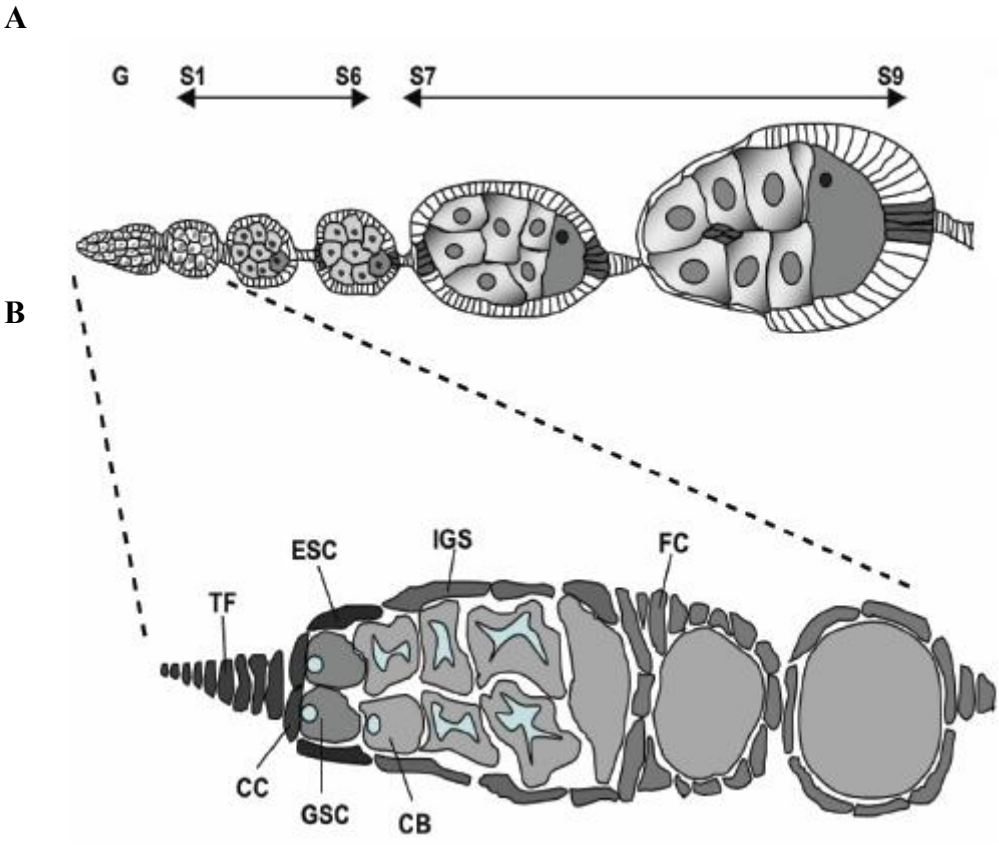

Figura I.1: Diagrama de um ovaríolo de *Drosophila*. Em **A**, etapas da oogênese a partir do germário anterior (G) até o estágio 9 (S1-S9), com o ovócito em desenvolvimento na parte posterior da câmara ovocitária. Em **B**, o germário em detalhe mostrando o filamento terminal (TF) e as células basais (CC), que formam o nicho de células-tronco, com as células-tronco germinativas (GSC). A divisão de uma GSC produz uma nova célula-tronco e uma célula-filha que formará os citoblastos (CB) que, por sua vez, ficam rodeados pelas células da bainha interna do germário (IGS). Anteriores às IGS estão as células-tronco companheiras. As células CB, ao se dividirem, forma cistos, que são englobados por células foliculares (FC). [Adaptada de Bina e Zeidler (2009)].

A proteína humana ortóloga a orb é a CPEB1 (***C****ytoplasmic* ***P****olyadenilation* ***E****lement* ***B****inding protein* ***1***, MIM 607342), que foi originalmente identificada em ovócitos de *Xenopus*, atuando na maturação dos ovócitos e no início do desenvolvimento embrionário. Em neurônios de mamíferos, CPEB1 fica localizada nos dendritos e está presente na região pós-sináptica. Em anfíbios e mamíferos, CPEB1 participa da regulação

da tradução (revisão em Wells 2006). Entretanto não foram descritas interações entre CPEB1 e FMRP nesse processo.

Fêmeas adultas de camundongos nocautes quanto ao gene *Cpeb* apresentaram ovários vestigiais desprovidos de ovócitos. Os ovários de embriões de fêmeas normais e nocaute, aos 16,5 dias pós-coito, continham células germinativas na fase de paquíteno; porém nos ovários das fêmeas nocaute foi observada fragmentação do DNA, o que não ocorria nos ovários das fêmeas normais. Aos 18,5 dias, os ovários das fêmeas nocaute continuavam com as células germinativas em paquíteno, enquanto nas fêmeas selvagens, havia células em paquíteno, mas a maioria já estava na fase de diplóteno. Camundongos machos, nocautes quanto ao gene *Cpeb*, também tinham células germinativas estacionadas em paquíteno. Não foram observados complexos sinaptonêmicos, tanto em machos quanto em fêmeas nocautes. Assim, concluiu-se que Cpeb controla a diferenciação das células germinativas, regulando a formação do complexo sinaptonêmico, na transição entre paquíteno e o diplóteno da prófase meiótica (Tay e Richter 2001).

Yang e col. (2007), determinaram que o *dFmr1* é necessário para o controle do destino das células-tronco germinativas (***G**ermline **S**tem **C**ells*, GSC) e o faz interagindo com *Ago1* - um componente-chave do complexo RISC da via de biogênese de microRNA (miRNA). Essa conclusão se baseou nos resultados de experimentos de coimunoprecipitação (IP), usando anticorpo anti-Ago1 em lisados de ovário, com posterior detecção da dFmrp por *Western blotting*. A perda de uma cópia de *Ago1* potencializa o fenótipo *dFmr1* de diminuição do número de GSC nos germários, sugerindo que ambos podem agir na mesma via para coordenar o destino das GSC. Para elucidar se a dFmrp utiliza microRNAs específicos para desempenhar essa função, o mesmo grupo (Yang e col. 2009) realizou experimentos de IP seguidos de PCR quantitativo em tempo real e identificou a associação específica entre a dFmrp e determinados miRNA. Focando a participação de *Bantam* - um miRNA de 21 nucleotídeos que participa da regulação do ciclo celular - na via de modulação de tradução mediada pela dFmrp, demonstrou que ambos interagem na regulação do destino das GSC. No desenvolvimento neuronal da drosófila, a dFmrp participa da via de miRNA, interagindo com Ago1 e Dcr-1 (responsável por converter pré-microRNA em micro RNA maduros); há queda significativa dos níveis

do complexo Dcr-1-Ago1 na ausência de dFmrp, sugerindo que esta facilitaria a formação do complexo (Xu e col. 2008).

Outro alvo de regulação pela dFmrp é o transcrito do gene *cbl*, que codifica uma ubiquitina ligase E3 que também atua na ovulogênese; essa interação é necessária para a correta proliferação das células germinativas. As fêmeas de drosófila de linhagens nocautes quanto ao *dFmr1* exibem câmaras ovocitárias com número maior ou menor de células germinativas do que as fêmeas selvagens. Essas alterações nas linhagens nocautes são resgatadas pela redução da proteína cbl no ovário, indicando que cbl deve mediar a função da dFmrp no controle da proliferação das células germinativas (Epstein e col. 2009).

O ortólogo de *cbl* em mamíferos, o protooncogene *CBL,* codifica uma ligase de ubiquitina que atua como regulador negativo de várias vias de sinalização de receptores de tirosina quinase e como proteína adaptadora de sinalização dependente de fosforilação da tirosina (revisão em Smit e Borst 1997).

Já a regulação do próprio *dFmr1* no ovário da drosófila é feita por Ago2 (Pepper e col. 2009). Mutantes nulos quanto a *dFmr1* ou com quatro cópias de *dFmr1* e nulos quanto a Ago2 exibem múltiplos defeitos na ovulogênese, como a presença de dois ovócitos em uma única câmara. Já mutantes nulos quanto a Ago2 mantêm a distribuição da dFmrp, com maior concentração no ovócito, porém os níveis da proteína na câmara do ovócito são quatro vezes mais altos em comparação com linhagens normais, enquanto os níveis do mRNA de *dFmr1* estão aumentados em 50%; essas observações indicam que, na ausência de Ago2, ocorre aumento da tradução do mRNA do *dFmr1*. Apesar de Ago2 ser o componente-chave da via de micro RNA de interferência (miRNA), os autores não encontraram evidências de que *dFmr1* seja um alvo direto da via canônica endógena de miRNA. Uma linhagem de moscas que contém uma mutação de ponto em Ago2, que não modifica seus níveis de expressão, mas sim sua atividade de clivagem, não manifesta alteração na expressão da dFmrp na câmara do ovócito, sugerindo que a regulação da dFmrp por Ago2 é independente da função do domínio catalítico de Ago2.

Em neurônios da junção neuromuscular (NMJ), a repressão do *dFmr1* mediada por *Ago2* previne defeitos de ramificação e crescimento do axônio. Os defeitos na neurogênese em larvas, mutantes nulos quanto a *dFmr1* e *Ago2*, são semelhantes àqueles dos mutantes nulos quanto ao *dFmr1*. No entanto, animais com um alelo *Ago2* mutante, que produz Ago2

com redução significativa na atividade catalítica de endorribonuclease, é normal quanto aos fenótipos examinados da NMJ (Pepper e col. 2009).

Os ortólogos de *Ago1* e *Ago2* em humanos são os genes *EIF2C1* e *EIF2C2*, dos fatores de iniciação de tradução eucarióticos 2C1 e 2C2, respectivamente. A expressão de ambos é ubíqua. Os produtos desses genes participam da via de siRNA e estão presentes no RISC.

I.7 Mecanismos moleculares dos distúrbios associados à pré-mutação do *FMR1*

As alterações no gene *FMR1* podem originar a síndrome do cromosomo X frágil, quando o gene está completamente mutado, e a FXTAS ou a FXPOI, quando pré-mutado. Entretanto, os mecanismos patológicos dos distúrbios relacionados à mutação completa e à pré-mutação são distintos. A síndrome do cromossomo X frágil tem penetrância completa no sexo masculino e é devida à ausência da FMRP; já os distúrbios associados à pré-mutação do *FMR1* possuem penetrância incompleta e ainda não tiveram seu mecanismo molecular claramente elucidado. As características moleculares da repetição $(CGG)_n$, como tamanho e padrão de interrupção por trincas (AGG), anormalidades na transcrição e na tradução do *FMR1*, o ganho de função tóxico pelo mRNA e o padrão de inativação do cromossomo X parecem influenciar a manifestação de FXTAS e de FXPOI.

O fato de pessoas portadoras de mutação completa não apresentarem as patologias associadas à pré-mutação (FXTAS e FXPOI) mostram que esses distúrbios não estão associados à ausência da FMRP. Essa conclusão é apoiada também pela observação de que camundongos nocautes quanto ao *Fmr1* são férteis (The Dutch-Belgian Fragile X Consortium, 1994).

A hipótese de que um ganho de função tóxica pelo mRNA da pré-mutação do *FMR1* seria a causa da FXTAS foi proposta com base na observação do aumento dos níveis do mRNA nos portadores de pré-mutação (Tassone e col. 2000) e no modelo de ganho de função do RNA na distrofia miotônica de Steinert (DM1 e 2, MIM 160900 e MIM 602688). Nesse modelo, tanto a expansão de repetições CUG na 3'-UTR do transcrito do gene *DMPK* (***D****ystrophia* ***M****yotonica* ***P****rotein* ***K****inase*, MIM 605377) na DM1, quanto a expansão de repetições CCUG no primeiro íntron do gene *ZNF9* (***Z****i****N****c* ***F****inger* 9, MIM 116955), na

DM2, promoveriam o seqüestro de uma ou mais proteínas que se ligam a repetições C(C)UG (revisão em Hagerman e Hagerman, 2004). Exames neuropatológicos *post-mortem* em indivíduos afetados pela FXTAS (Greco e col. 2002) revelaram outro paralelo entre a FXTAS e a DM: a formação de inclusões intranucleares ricas em ubiquitina, em neurônios e astrócitos. Na FXTAS, foi detectada a presença do mRNA do *FMR1* nas inclusões nucleares (Tassone e col. 2004) e foi demonstrado que a formação das inclusões é correlaciona-se com o excesso de RNA com a expansão de repetições CGG (Tassone e col. 2004, Greco e col. 2006). Arocena e col. (2005) mostraram que a presença do transcrito com a expansão CGG no núcleo é suficiente para a redução da viabilidade celular independentemente da formação de inclusões. Esse conjunto de dados apoia a hipótese do mecanismo de ganho de função tóxica pelo mRNA do *FMR1* pré-mutado.

Buscando os mecanismos pelos quais a pré-mutação levaria à FXTAS em homens, Tassone e col. (2000) examinaram a relação entre o número de repetições CGG no *FMR1* e os níveis do transcrito e da FMRP, em sangue periférico, e observaram que, para os alelos $(CGG)_{100\text{-}200}$, os níveis de mRNA do *FMR1* são aproximadamente cinco vezes superiores aos níveis encontrados em indivíduos normais, enquanto os níveis da FMRP estão reduzidos. Interessantemente, em mulheres, foi encontrada correlação positiva significativa entre os níveis do mRNA do *FMR1* em sangue periférico e o número de repetições na faixa da pré-mutação com repetições $(CGG)_{55\text{-}99}$, mas essa correlação diminuiu a partir de repetições $(CGG)_{100\text{-}200.}$ Quando se levou em conta a inativação do cromossomo X, verificou-se que os níveis de mRNA aumentam com o número de repetições CGG e que esse aumento é altamente significativo na faixa $(CGG)_{100\text{-}200}$. Assim, os níveis de mRNA tendem à normalidade nas mulheres conforme o número de repetições aumenta na faixa de $(CGG)_{100\text{-}200}$, devido a inativação predominante do cromossomo X portador das pré-mutações com as maiores repetições(García-Alegria e col. 2007).

A análise da distribuição do mRNA do *FMR1* no perfil polissomal de linhagens linfoblastóides de homens pré-mutados mostrou que a associação entre estes, que é alta em células normais, diminuiu progressivamente com o aumento do tamanho das repetições CGG, indicando que a eficiência da tradução está reduzida (Primerano e col. 2002). A comparação da atividade transcricional de alelos normais e pré-mutados do *FMR1* mostrou que a síntese de transcritos pelos alelos pré-mutados está aumentada, indicando que os

níveis elevados do mRNA são, pelo menos em parte, decorrentes do aumento da transcrição (Tassone e col. 2007). Os autores propuseram, como alvos terapêuticos para a FXTAS, o mRNA *per se* ou o promotor do *FMR1*, visando a redução dirigida dos níveis do mRNA.

A relação entre o tamanho das repetições CGG e os níveis do transcrito e da FMRP no sangue pode não ser linear. Um estudo mostrou que os níveis de FMRP em homens portadores de alelos na faixa de repetições $(CGG)_{80-89}$ são mais elevados do que nos portadores de repetições $(CGG)_{54-79}$ e $(CGG)_{90-120}$, apontando para maior eficiência da tradução do mRNA de pré-mutações com repetições $(CGG)_{80-89}$ (Peprah e col. 2010). Essas observações são incompatíveis com o mecanismo de acúmulo de mRNA por aumento da transcrição devido à dificuldade de tradução proposto por Tassone e col. (2007). Assim, Peprah e col. (2010) sugeriram que esses achados podem constituir um evento casual em sua amostra, mas que podem decorrer de propriedades relacionadas à conformação do transcrito de acordo com o tamanho das repetições CGG, a estrutura da repetição ou o sítio de início de transcrição.

Experimentos de tradução *in vitro*, usando construções contendo mRNA repórter com 0, 16, 30, 62 e 99 trincas CGG e a 5’ UTR do *FMR1* ou de outra sequência não relacionada , foram realizados para avaliar a iniciação e a eficiência da tradução na presença das diferentes repetições.. Foi demonstrado que a tradução de cada espécie sintética de mRNA é duas a três vezes mais eficiente no contexto da 5’ UTR do *FMR1*, em comparação com a 5´UTR heteróloga e que a inibição na tradução aumenta com o número de repetições CGG, em ambos os tipos de construções), indicando que a organização da 5’ UTR do *FMR1* atenua, porém não elimina a queda na eficiência de tradução devida à expansão da repetição CGG (Ludwig e col. 2011). Na presença da 5'UTR do *FMR1* contendo repetição CGG, a queda na expressão da proteína repórter com relação à da construção com $(CGG)_0$ foi de 23% e 60% naquelas que continham $(CGG)_{16}$ $(CGG)_{99}$, respectivamente (Ludwig e col. 2011). Essas observações apóiam o modelo de acúmulo de mRNA por aumento da transcrição devido à dificuldade de tradução proposto por Hagerman e Hagerman (2004).

Alguns estudos correlacionaram o número de trincas CGG e a presença de interrupções da repetição por trinucleotídeos AGG com a manifestação dos distúrbios relacionados à pré-mutação. Napierala e col. (2005) previram que a estrutura secundária da

região 5´UTR do mRNA seria influenciada pela organização da repetição CGG, de forma que os segmentos ininterruptos formariam estruturas de grampos com fitas perfeitamente emparelhadas, enquanto as interrupções AGG diminuiriam o tamanho dos grampos o que, por sua vez, aumentaria a eficiência e a iniciação da tradução. Em uma amostra de 190 mulheres com POI, todas as nove que apresentaram alelos intermediários do *FMR1*, com $(CGG)_{43-50}$, as repetições eram ininterruptas e, portanto, formariam grampos grandes; nas duas mulheres do grupo controle portadoras de alelos intermediários $(CGG)_{51-53}$, as repetições CGG eram interrompidas por trincas AGG e formandriam, assim, grampos pequenos. Os autores concluíram que a manifestação da disfunção ovariana pode ser influenciada pelo padrão de interrupção da repetição CGG (Bodega e col. 2006).

Outro efeito da expansão CGG da pré-mutação é na posição de início da transcrição: quanto maior o número de repetições maior é o deslocamento à montante do ponto de entrada do ribossomo; assim, a repetição CGG agiria modulando a tradução (Beilina e col. 2004).

Willemsen e col. (2003) utilizaram um camundongo "*knock in*", no qual as repetições CGG endógenas do *Fmr1* foram substituídas por um trato de cerca de 100 trincas, a fim de testar a hipótese do ganho de função do RNA. Embora os camundongos não apresentassem anormalidades neurológicas e tivessem níveis normais da FMRP, foram detectadas inclusões intranucleares, que continham ubiquitina, no cérebro de todos os animais analisados. Estes dados reforçam a hipótese do ganho de função do RNA e de que a deficiência da proteína não influencia a ocorrência de FXTAS.

Achados similares foram obtidos em um modelo de drosófila (Jin e col. 2003). Uma repetição $(CGG)_{90}$ foi acoplada a um gene repórter heterólogo e a construção foi superexpressa seletivamente nos olhos das drosófilas, levando à formação de inclusões e neurodegeneração; o efeito, entretanto, não foi observado com um segmento com menos de 90 trincas CGG. Uma vez que o gene *dFmr1* não possui repetições CGG e que o transgene não codifica a dFmrp, o efeito patológico não deve decorrer de alteração na proteína, mas sim da presença do trato repetitivo do RNA.

Foram isoladas mais de 20 proteínas associadas às inclusões nucleares em cérebros de pacientes com FXTAS *post mortem*; entre elas, a αB-cristalina, a lamina A/C e diversos tipos de ubiquitina (Iwahashi e col. 2006). A αB-cristalina é um membro da família das

pequenas proteínas *heat shock* (sHsp) e acredita-se que atue na organização das proteínas do citoesqueleto e na supressão da agregação de proteínas, quando há estresse celular (Adhikari e col. 2004). As laminas intranucleares são componentes do citoesqueleto, organizadas em redes fibrosas na camada interna da membrana nuclear (Broers e col. 2005). As ubiquitinas, por sua vez, regulam a via de degradação ubiquitina-proteassoma, de forma que a ligação de multímeros de ubiquitinas a uma determinada proteína sinaliza sua seleção para degradação pelo proteassoma 26S (revisão em Nandi e col. 2006).

A transfecção de células neuronais cultivadas com uma construção, contendo $(CGG)_{88}$ na 5'UTR de um gene repórter, induziu inclusões nucleares; foi detectada αB-cristalina em grande quantidade e a desregulação da distribuição de lamina A/C. Esses achados permitiram identificar outras similaridades entre a FXTAS e outras doenças neurodegenerativas (Arocena e col. 2005), uma vez que o excesso de αB-cristalina é característico de distúrbios como as doenças de Alexander (MIM 203450), Parkinson (MIM 168600) e Creutzfeldt-Jakob (MIM 123400), nas quais a proteína aparece em associação com agregados de filamentos intermediários que, por sua vez, são componentes do citoesqueleto. Nessas doenças neurodegenerativas, a própria formação dos agregados pode refletir a falha da αB-cristalina em resolver adequadamente a desorganização da arquitetura dos filamentos intermediários. Assim, Arocena e col. (2005) sugeriram que a presença de αB-cristalina nas inclusões nucleares pode constituir uma resposta similar à desorganização da rede de filamentos intranucleares, particularmente do arranjo da lamina A/C no nucleoplasma, na FXTAS. Não foi observada a presença de ubiquitina nas inclusões, nas células cultivadas, o que indica que a formação das inclusões não é uma conseqüência de falha na degradação proteassômica. A incorporação de ubiquitina às inclusões nucleares de neurônios e astrócitos na FXTAS seria um evento tardio na patogênese da doença.

A presença de lamina A/C nas inclusões das células transfectadas e no cérebro de pacientes com FXTAS sugere que o mRNA com a repetição expandida provoca o rompimento da organização normal dos filamentos na periferia do núcleo (Arocena e col. 2005). Os autores salientam que a desorganização da lamina A/C na FXTAS é muito semelhante à observada em neuropatias devidas a mutações no gene *Lamin A/C* - *LMNA*, MIM 150330 (Hutchison e col. 2002, Omary e col. 2004). Ocorrem também características

clínicas coincidentes entre a FXTAS e as laminopatias, por exemplo, a neuropatia periférica presente na síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipo 2 (CMT2B1, MIM 605588) e na FXTAS, manifestada pela diminuição do reflexo e da sensibilidade à pressão e pela redução na velocidade da condução nervosa (Jacquemont e col. 2003).

No estudo da formação das inclusões em vários tipos celulares - como cultura primária de hipocampo embrionário de rato e linhagens imortalizadas de neurônios, ovários e rins - foi demonstrado que, em células COS transfectadas com plasmídios contendo repetições CGG com tamanhos nas faixas dos alelos comuns e das pré-mutações, moléculas de mRNA contendo a repetição CGG expandida recrutam sequencialmente várias proteínas que se ligam ao RNA e participam da regulação do *splicing* alternativo; primeiramente Sam68, e então hnRNP-G e MBLN1 (Sellier e col. 2010). Assim, foi proposto um modelo no qual Sam68 é sequestrada pelas repetições CGG expandidas, alterando sua função de regulação do *splicing*. Consequentemente, o *splicing* regulado por Sam68 seria alterado nos afetados por FXTAS. Adicionalmente, Sellier e col. (2010) mostraram que a regulação da fosforilação de tirosina de Sam68 modula sua localização nos agregados com a repetição CGG; observaram também que a tautomicina impede o sequestro de Sam68 pela repetição CGG na faixa da pré-mutação e Sam68. Os autores sugeriram essa como uma possível via-alvo para tratamento da FXTAS.

Vários sintomas da FXTAS, incluindo ataxia, disautonomia, neuropatia periférica, fraqueza e problemas psiquiátricos, coincidem com sintomas das deficiências em enzimas da cadeia respiratória mitocondrial. Em um estudo longitudinal que investigou a possível conexão funcional entre FXTAS e disfunção mitocondrial, fibroblastos e amostras de cérebro de indivíduos portadores de pré-mutação, com e sem FXTAS, e número variável de repetições CGG, foram testados quanto à expressão de proteínas mitocondriais e a ocorrência de proteínas modificadas resultantes do aumento de estresse oxidativo/nitrativo (Ross-Inta e col. 2010). Os resultados mostraram que a disfunção mitocondrial ocorre nos indivíduos, mesmo quando ainda não apresentam as características evidentes de FXTAS. Tanto a disfunção mitocondrial quanto os danos por estresse oxidativo/nitrativo puderam ser observadas, naqueles indivíduos que vieram a apresentar a FXTAS, antes mesmo de seus sintomas aparecerem. Os autores ressaltaram a importância dessas observações para o diagnóstico e o monitoramento do paciente, uma vez que a detecção da disfunção

mitocondrial pode prever o estabelecimento da FXTAS e, assim, possibilitar intervenções terapêuticas precoces (Ross-Inta e col. 2010).

I.8 – Este trabalho

Considerando que a função do gene *FMR1* no ovário de mamíferos é pouco conhecida, este trabalho foi planejado com o objetivo de avaliar a expressão e localização subcelular do mRNA e da proteína do gene *FMR1* no ovário humano e murino, utilizando as células da granulosa.

Planejamos ainda utilizar a linhagem de camundongos *knock in* quanto a repetição CGG na faixa da pré-mutação humana (KI), obtida Entezam e col. (2007), para comparar a expressão do gene *FMR1* no ovário dessas fêmeas e no de fêmeas selvagens. Porém, após iniciarmos os experimentos, fomos informados que estudos do *Fmr1* no ovário de fêmeas KI estavam sendo conduzidos pelo grupo que nos cedeu os animais e que, na verdade, estávamos autorizadas a obter linhagem de células tronco embrionárias KI e nelas realizar o estudo do *FMR1*.

Durante o cultivo de embriões para obtenção da linhagem de células tronco KI, tivemos a oportunidade de comparar o início do desenvolvimento desses embriões com aqueles de fêmeas selvagens.

CAPÍTULO II

A expressão do gene *FMR1* em células ovarianas humanas e murinas

II.1. Introdução

Os efeitos da pré-mutação do gene *FMR1* sobre sua transcrição e sua tradução foram estudados originalmente em sangue periférico (Tassone e col. 2000, Allen e col. 2004, Tassone e col. 2006) e alterações celulares causadas pela pré-mutação foram relatadas em neurônios visualizados em cortes histológicos de cérebro *post-mortem* (Tassone e col. 2004), em células neuronais em cultura (Arocena e col. 2005), em fibroblastos cultivados (Arocena e col. 2009) e em cortes histológicos de gônada masculina (Greco e col. 2007). Não há, entretanto, trabalhos sobre a expressão da pré-mutação da *FMR1* e as possíveis alterações celulares em tecidos ovarianos. Um estudo sobre a FMRP no desenvolvimento do ovário humano foi realizado em fetos normais e portadores de mutação completa do *FMR1*; nos ovários de ambos os fetos, a FMRP foi encontrada em todas as células germinativas, envoltas por células da paragranulosa e intersticiais, que não expressavam a proteína (Rife e col. 2004).

A coloração por imunoistoquímica em cortes histológicos de ovários humanos, coletados de mulheres aos cinco meses, dez anos e dezenove anos de idade, revelou que, em folículos imaturos, a FMRP está presente nas células da granulosa, mas não nos ovócitos (Schuettler e col. 2011). No banco de dados eletrônico GeneCards, consta que a expressão do *FMR1* foi detectada em tecido ovariano humano por *array* de expressão e *Northern* eletrônico.

Em camundongos, a expressão do transcrito do *Fmr1* é alta no ovário fetal, no estágio em que ocorre a proliferação das ovogônias, mas no ovário maduro não foi encontrada expressão significativa (Bachner e col. 1993). A Fmrp foi detectada na crista genital do embrião e, em fêmeas adultas, nas células da granulosa de folículos imaturos (Hergersberg e col. 1995) e no citoplasma do ovócito, na zona pelúcida, na região antral e nas células da granulosa, dos folículos em crescimento (Bakker e col. 2000).

Em conjunto, os dados referentes à expressão do transcrito e da proteína em ovários de camundongos e humanos indicam que o gene *FMR1* deva participar no processo de proliferação das células germinativas e, após o nascimento, parece ficar inativo ou ter expressão basal até o recrutamento dos folículos, quando passa novamente a ter expressão significativa.

Neste estudo, avaliamos a expressão do gene *FMR1* no ovário adulto humano e murino. No ovário humano, as enormes dificuldades inerentes à obtenção de células germinativas de mulheres normais e especialmente das portadoras de pré-mutação do *FMR1* levaram-nos a considerar o uso de células humanas da granulosa (HGC), as células ovarianas de mais fácil obtenção por serem subprodutos dos procedimentos de fertilização *in vitro*. Já no ovário murino, analisamos a expressão do *Fmr1* em ovócitos e células murinas da granulosa (MGC), em fêmeas da linhagem de camundongos CD1.

As células da granulosa interagem funcionalmente com os ovócitos durante a foliculogênese por meio de hormônios e fatores de crescimento, transmitindo sinais através do ovário e apoiando o crescimento e a maturação dos ovócitos durante as últimas fases do crescimento folicular (revisado em Huang e Wells, 2010). É, portanto, possível que alterações celulares induzidas pela pré-mutação do *FMR1* nas HGC afetem o crescimento folicular, a taxa de ovulação e a fecundidade.

II.2. Objetivos

Nosso objetivo foi caracterizar a expressão do *FMR1* no ovário adulto humano, utilizando as HGC, e no ovário murino, utilizando ovócitos e as MGC. Para humanos, estabelecemos protocolos de isolamento e cultivo de HGC a partir de líquido folicular coletado em ciclos de fertilização assistida com indução de superovulação; verificamos a expressão do mRNA do *FMR1* por RT-PCR e da FMRP, por *Western Blotting* e determinamos a localização subcelular do mRNA do *FMR1*, por RNA-FISH, e da FMRP, por imunocoloração. Além disso, estudamos o comportamento da FMRP nas HGC após indução de estresse oxidativo.

Para estudo da expressão do *Fmr1* no ovário murino, induzimos a ovulação em fêmeas da linhagem CD1 e coletamos, no oviduto, ovócitos e MGC. Investigamos a

produção do mRNA nos ovócitos e nas MGC, por RT-PCR, e a localização da FMRP, por imunocoloração.

II.3. Material e Métodos

As HGC e as MGC foram coletadas utilizando-se diferentes metodologias. Em ambos os casos, houve hiper-estimulação da ovulação previamente à coleta de material. As HGC foram coletadas por punção folicular, e se fez necessário o isolamento dessas células do líquido folicular por centrifugação em gradiente de Percoll. As MGC foram coletadas no oviduto e os ovócitos foram separados mecanicamente.

A quantidade de HGC coletada por paciente é muito maior do que a quantidade de MGC coletada por fêmea de camundongo e, assim, diferentes protocolos foram utilizados para o cultivo e o estudo da expressão do *FMR1* nas células da granulosa provenientes de mulheres e de fêmeas de camundongos.

II.3.1. Pacientes

Mulheres submetidas a ciclos de fertilização assistida foram selecionadas entre pacientes do Centro de Fertilização Assistida Fertility, dirigido pelo Dr. Edson Borges Jr. Os critérios de inclusão foram a idade inferior aos 37 anos e a causa de infertilidade exclusivamente masculina. Um total de 44 amostras foram utilizadas neste estudo.

Todas as pacientes que realizam tratamento no Centro de Fertilização Assistida Fertility, obrigatoriamente, assinam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente ao início do tratamento proposto, concordando com os procedimentos a serem realizados, como estabelecido pelas normas éticas para utilização das técnicas de reprodução assistida (Resolução CFM nº 1358/92; Resolução CNS nº 196/96).

O protocolo desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Biociências, USP (Protocolo nº 061/2007).

II.3.2. Obtenção das amostras de HGC

No processo de reprodução assistida por fertilização *in vitro*, o líquido folicular é aspirado, por punção transvaginal, para coleta de ovócitos. As células mais abundantes no líquido aspirado são as da granulosa, que normalmente são descartadas. Assim, essas células podem ser obtidas a partir do líquido folicular sem interferir no processo de fertilização *in vitro* e sem que haja procedimento adicional. Os protocolos para estimulação ovariana e punção transvaginal para obtenção do líquido folicular foram os protocolos padrão do Centro de Fertilização Assistida Fertility.

II.3.3. Isolamento das HGC a partir do líquido folicular e cultivo

No líquido folicular obtido por punção transvaginal do ovário, há uma população heterogênea de células. Após a separação dos ovócitos, as células preponderantes são as HGC. Entretanto, durante a punção, o aspirado é contaminado com sangue e um passo fundamental para o cultivo de HGC é a remoção das células sangüíneas. Sabe-se, entretanto, que não se consegue obter suspensões totalmente puras (Beckmann e col. 1991, Wang e col. 1995). Quinn e col. (2006) descreveram um método de purificação de HGC a partir do líquido folicular, baseado na seleção de agregados celulares, após a remoção de hemácias por centrifugação em gradiente de Percoll. Os autores demonstraram a eficiência do método, utilizando marcadores das células da granulosa e das células brancas do sangue. Elegemos esse método de purificação, assim como as condições gerais de cultura descritas por Quinn e col. (2006) e testamos quatro protocolos com o objetivo de avaliar, em nossas condições de coleta, os procedimentos que levassem a maior eliminação de hemácias, melhor crescimento celular e maior sobrevivência das células em cultura. A Tabela II.1 resume os procedimentos dos protocolos 1 a 4.

Em todos os protocolos, utilizamos gradiente de Percoll para a separação das hemácias. O líquido folicular aspirado foi transferido para tubo com Percoll (GE Healthcare) a 50% em solução salina tamponada com fosfato (PBS: Na_2HPO_4 0,08M; NaH_2PO_4 0,02M; NaCl 0,15M), seguindo-se centrifugação a 1500 rpm por 10 min.

Protocolo 1

No Protocolo 1, centrifugamos o líquido folicular em gradiente de Percoll (volume igual de Percoll a 50% e líquido folicular) à temperatura ambiente e transferimos as células da interface para placa de Petri; após lavagem em meio nutritivo HAM F-10 (GIBCO Invitrogen Life Technologies), submetemos o material a centrifugação a 1000 rpm por 1 min. Removemos o sobrenadante e ressuspendemos o *pellet* em meio HAM F-10. Diante das recomendações para purificação imediata das HGC a serem cultivadas, realizamos todo esse processo no Centro de Fertilização Assistida e transportamos as células para o Laboratório de Genética Humana IB-USP, em gelo. Após centrifugação, ressuspendemos as células em meio de cultivo e desagregamos parcialmente os grumos, usando pipeta, para então semear a cultura, transferindo as células em suspensão para poços em placas de cultura.

Protocolo 2

Introduzimos o Protocolo 2 porque, segundo Quinn e col. (2006), a centrifugação em gradiente de Percoll deve ser realizada a 4 ^{o}C; como a Clínica de fertilização não dispunha de centrífuga refrigerada, passamos a realizar esse passo no Laboratório. Na Clínica, centrifugamos o líquido folicular por 5 min a 900 rpm à temperatura ambiente e ressuspendemos o *pellet* em meio HAM F-10, soro fetal bovino (SFB) a 10%, penicilina/estreptomicina (P/S) a 1 %; repetimos a centrifugação, ressuspendemos as células no meio em que seriam cultivadas [DMEM/F-12 (GIBCO Invitrogen Life Technologies), SFB a 10%, P/S a 1%] e procedemos então ao transporte do material, em gelo. No Laboratório, centrifugamos as células em gradiente de Percoll a 4 ^{o}C. Lavamos duas vezes o material em HAM F-10, SFB a 10%, P/S a 1%, centrifugamos por 5 min, 900 rpm, a 4 ^{o}C e ressuspendemos as células em meio de cultura. Realizamos a desagregação mecânica parcial dos grumos para semear a cultura, transferindo as células em suspensão para poços em placas de cultura.

Protocolo 3

O Protocolo 3 foi baseado nos dois anteriores e no descrito por Pellicer e col. (1998). Centrifugamos o líquido folicular por 5 min a 900 rpm, ressuspendemos o *pellet* contendo HGC e hemácias em HAM F-10 com SFB a 10% e P/S a 1% e centrifugamos a

suspensão em gradiente de Percoll a 1500 rpm por 10 min. O transporte para o laboratório foi feito em meio DMEM/F-12, SFB a 10% e P/S a 1% em gelo e, após centrifugarmos novamente a 900 rpm por 5 min.a 4 ºC, realizamos a desagregação parcial dos grumos com pipeta para semear a cultura, transferindo as células em suspensão para poços em placas de cultura.

Protocolo 4

Centrifugamos o líquido folicular em gradiente de Percoll à temperatura ambiente, aumentando a velocidade de centrifugação para 2.000 rpm. Ressuspendemos as células coletadas na interface em meio DMEM/F-12, SFB a 30% e P/S a 1%, para o transporte. No laboratório, após centrifugação por 5 min, 900 rpm a 4 ºC, ressuspendemos as células no mesmo meio e dissecamos os grumos sob microscópio estereoscópico, separando-os mecanicamente de pequenos coágulos com o auxílio de agulhas de 25 g, para minimizar a presença de hemácias na cultura. Para aumentar a fixação dos grumos à superfície da placa, semeamos pequenas gotas da suspensão nos poços e, após 3 horas, adicionamos mais meio de cultura.

No protocolo 1, o primeiro passo consistiu na centrifugação do líquido folicular em gradiente de Percoll, separando-se a maior parte das hemácias das HGC antes do que ocorria nos protocolos 2 e 3, em que as hemácias permaneceram mais tempo em contato com as HGC, durante o transporte para o laboratório. Nesses dois protocolos, após as etapas de lavagem, centrifugação e transporte, as hemácias e as HGC apareciam aderidas, resultando na presença de maior número de hemácias na cultura. Diante de evidências de que fatores derivados das hemácias afetam a expressão gênica de células em cultura (Crinelli e col. 2000), no protocolo 4, voltamos a centrifugar o líquido folicular em gradiente de Percoll ainda na clínica, mesmo à temperatura ambiente.

Não notamos diferença em relação à porcentagem de células viáveis (ver item *II.3.4*) no momento de semear a cultura, que se manteve entre 60 e 70%, quando consideramos os diferentes meios utilizados para transporte das amostras.

Tabela II.1: Comparação dos Protocolos 1 a 4 para isolamento das HGC a partir do líquido folicular.

Procedimento	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4
Separação das células do líquido folicular por centrifugação antes do gradiente de Percoll	não	sim	sim	não
Temperatura e local de centrifugação em gradiente de Percoll	Temperatura ambiente (clínica)	4 ºC (laboratório)	4 ºC (laboratório)	Temperatura ambiente (clínica)
Meio utilizado no transporte das células	HAM F-10	HAM F-10	DMEM/F-12, 10% SFB, 1% P/S	DMEM/F-12, 30% SFB, 1% P/S
Forma de semear a cultura	células em suspensão	células em suspensão	células em suspensão	gotas

Ao semearmos as HGC após desagregação parcial ou total dos grumos, usando pipeta, de acordo com os protocolos 1 a 3, grande parte das células e grumos não aderia à superfície do poço. No protocolo 4, o ato de semear a cultura em forma de gotas para mais tarde adicionar mais meio à cultura garantiu maior adesão das HGC à superfície. Outra vantagem foi a introdução da dissecção dos grumos de forma a separar as HGC das hemácias, o que permitiu a diminuição da contaminação da cultura com hemácias. O protocolo 4 foi então adotado para todas as culturas de HGC.

II.3.4. Teste de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi feito pelo método de exclusão do corante azul de tripan, adicionando-se o corante a 4% a uma alíquota da suspensão de células utilizada para semear a cultura, na proporção de 1:1. Em seguida, uma gota da suspensão foi montada entre lâmina e lamínula e observada em microscópio estereoscópico; foram consideradas vivas as células não coradas.

II.3.5. Cultivo das HGC

O cultivo das HGC foi realizado de acordo com as condições gerais descritas por Quinn e col (2006). As placas de cultura foram revestidas com 10 µg/mL de laminina de camundongo (Invitrogen Life Technologies) em PBS, mantidas a 4 ºC por pelo menos 24h e então lavadas duas vezes com PBS, para receber as células. O meio de cultivo utilizado foi o Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM): Ham F12 com Glutamax (Invitrogen Life Technologies), suplementado com SFB a 30% inativado pelo calor por 20 min a 56º C, adicionando-se solução de penicilina/estreptomicina (Invitrogen Life Technologies), na concentração final de 100 U/mL. As células foram cultivadas a 37 ^{o}C, 5% de CO_2 e o meio de cultivo foi trocado a cada dois dias.

II.3.6. Caracterização das HGC

Expressão de mRNA de marcadores de HGC (FSHR, LHCGR) em células isoladas do líquido folicular

A expressão dos transcritos de marcadores de HGC e do gene *FMR1* foi avaliada em células isoladas do líquido folicular. O RNA foi extraído com Trizol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. As células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1000 rpm por 10 min, duas vezes. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de Trizol e homogeneizado com ajuda de agulha acoplada a seringa. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio e após 2 a 3 min à temperatura ambiente, procedeu-se a centrifugação a 2.800 rpm por 15 min a 4º C; o sobrenadante foi transferido para novo tubo e nele foi adicionado 1 mL de isopropanol. Após 10 min à temperatura ambiente, o material foi submetido à centrifugação a 2.800 rpm por 10 min a 4 ºC e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de etanol 75% em H_2O [destilada, deionizada, tratada com dietil policarbonato (DEPC) a 0,1% por 30 min a 37º C e autoclavada: H_2O-DEPC] e a suspensão, centrifugada a 1.800 rpm por 5 min a 4 ºC; após rápida secagem ao ar, procedeu-se à ressuspensão em 20 µL de H_2O-DEPC.

Em seguida, o RNA total foi utilizado como molde para geração de cDNA em reação de RT-PCR, utilizando o kit SuperScript III First-strand Synthesis (Invitrogen), em volume final de 50 µL, na presença de 1 U da transcriptase reversa, 1x o tampão da enzima, 40 U de inibidor de RNase, dNTP 200 µM, 1 µM de *primers* oligo dT e 10 µM de *primers* randômicos. O mRNA total foi previamente desnaturado por 10 min a 65 ^{o}C, adicionado ao mix da reação de RT-PCR e incubado a 42 °C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos. As amostras foram então resfriadas em gelo, tratadas com 1 U de RNAse H e incubadas a 37 °C por 20 minutos.

O cDNA obtido foi amplificado por PCR. A reação teve volume final de 25 µL, na presença de 1 U de *Taq* polimerase (Invitrogen), 1x o tampão da enzima, MgCl 25 mM, dNTP 200 µM cada e 15 pmoles de cada *primer*. O programa do termociclador consistiu de uma etapa de desnaturação inicial de 10 min a 94 ^{o}C, seguida de 30 ciclos de 1 min a 94 ^{o}C, 30s a 52° C e 1 min a 72 ^{o}C, e de uma etapa de extensão final de 7 min a 72° C. Os *primers* foram desenhados com ajuda do *software* Primer3 (v. 0.4.0), de forma a amplificar segmentos de cDNA correspondentes aos mRNA dos receptores de hormônio folículoestimulante (FSHR) e de

hormônio luteinizante/coriogonadotropina (LHCGR), ambos marcadores das HGC e ao mRNA de β-actina, como controle positivo. As sequências dos transcritos foram obtidas no banco de dados Ensembl. Para a detecção do mRNA do *FMR1*, utilizamos os *primers* descritos por Eiges e col. (2007).

Os *primers* usados para amplificar segmentos do cDNA foram:
FSHR forward: 5'- atgctgctggctttttcact - 3' e *FSHR reverse*: 5'- gatgccaaagatgggaaaga - 3';
LHCGR forward: 5'- acctgcatggcacctatctc - 3' e *LHCGR reverse*: 5'- ccatttttgcagttggaggt - 3';
β-actina forward: 5'- ggacttcgagcaagagatgg - 3' e *β-actina reverse*: 5'- agcactgtgttggcgtacag - 3'.

Investigação da origem dos grânulos citoplasmáticos

As células da granulosa do ovário são assim denominadas por possuírem grânulos citoplasmáticos de natureza lipídica, devido à elevada síntese de esteróis por essas células (Junqueira e Carneiro, 2004). Para confirmar a origem lipídica dos grânulos citoplasmáticos das células em cultura, foi realizada coloração com o corante lipofílico DiI. A imunocoloração indireta da α-tubulina, que tem distribuição citoplasmática, foi realizada para identificação do citoplasma nas preparações.

As células em cultura foram tratadas com o corante lipofílico DiI conjugado a rodamina (Invitrogen Life Technologies), 1:1000 em meio de cultura, incubando-se por 8 min a 37 ^{o}C e em seguida, 15 min a 4 ^{o}C. Para a fixação foi utilizada formalina (Sigma) por 20 min a 37 ^{o}C, prosseguindo-se à imunocoloração com anticorpo primário monoclonal anti-α-tubulina produzido em camundongo (1:2000 por 60 min em temperatura ambiente, TA) e secundário anti-camundongo obtido em coelho, conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:1000, 60 min, TA). A lamínula foi montada sobre lâmina com DAPI:Vectashield 1:500 e selada com esmalte. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2. Para documentação, as imagens foram capturadas por câmara CCD e processadas utilizando-se o *software* Isis (Metasystems).

II.3.7. Estudo da expressão do transcrito de FMR1 pelas HGC

Para a confirmarmos a presença do transcrito do *FMR1* nas HGC, procedemos à extração de RNA, produção de cDNA por RT-PCR e em seguida PCR conforme descrito acima, utilizando o par de *primers* descrito por Eiges e col. (2007): *FMR1 forward*: 5'- cagctcaaagcgagcacat -3'; *FMR1 reverse*: 5'- aatagcagtgaccccaggt -3'. O amplicon no cDNA do *FMR1* abrange a junção dos exons 7 e 8; esse segmento é conservado nos seis transcritos do gene *FMR1* detectados em humanos (Ensembl Genome Browser). A Tabela II.2 mostra o tamanho de cada exon nos transcritos do *FMR1*, numerados de I a VI.

II.3.8. Estudo da localização subcelular do transcrito do FMR1 nas HGC por RNA-FISH

Para estudo da distribuição do mRNA do FMR1 nas HGC cultivadas, adotamos a metodologia de hibridação in situ fluorescente, com sondas de RNA (ribosondas) marcadas com biotina (RNA-FISH). Seguimos o protocolo de Bell e col. (2008).

Clonagem de segmento correspondente ao transcrito do FMR1

Para a detecção do mRNA do *FMR1* por RNA-FISH, foi desenhada uma sonda (Primer3) de 416 b, abrangendo parcialmente o exon 6 e estendendo-se até parte do exon 11 do transcrito.
O amplicon foi gerado por PCR, tendo como molde o cDNA obtido de RNA extraído de sangue periférico humano e usando os *primers:* sonda RNA-FISH *forward*: 5' - gaa gaagct agt aag cag ctg ga - 3' e sonda RNA-FISH *reverse*: 5' - ttg gaa ggt agg gaa ctt gg - 3'. O produto da PCR foi purificado, utilizando-se o GFX PCR and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience, GE Healthcare). O segmento foi clonado no vetor TOPO pCR 2.1 (Invitrogen) e inserido em bactérias *Escherichia coli*, linhagem DH5-α (Novagen), por eletroporação, de acordo com as instruções do fabricante do vetor. As bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar com 50 µg/mL de ampicilina, para selecionar aquelas que continham o vetor, e incubadas a 37 ºC por 16 horas. Após extração de DNA com Illustra Plasmidprep Mini Spin Kit (Amersham Bioscience, GE Healthcare), as colônias recombinantes foram identificadas por eletroforese em gel de agarose, após PCR com *primers* internos do vetor TOPO pCR 2.1, fornecidos pelo fabricante (Invitrogen).

Tabela II.2: Transcritos alternativos do gene *FMR1* humano (I a VI) e tamanho dos exons (1 a 17) (Ensembl Genome Browser). Notar que os exons 2 a 9 são conservados em todos os transcritos.

	Exons (pb)																
Transcritos alternativos	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**
I	193	53	94	72	149	94	117	171	79	110	135	87	196	108	83	2049	193
II	193	53	94	72	149	94	117	171	79	110	135	87	196	108	83	2049	
III	179	53	94	72	149	94	117	171	79	287							
IV	51	53	94	72	149	94	117	171	79	110	135	63	87	196	108	83	112
V	173	53	94	72	149	94	117	171	79	104	135	87	196	183	83	1096	
VI	193	53	94	72	149	94	117	171	79	110	135	63	87	196	183	83	2409

Para obtermos sondas de mRNA do *FMR1* nos sentidos *sense* (controle) e *antisense*, o amplicon deve inserir-se no vetor em ambos os sentidos. Assim, após identificação das colônias cujo DNA produziram amplicons de cerca de 600 pb, a presença do inserto e o sentido da inserção foram verificados por sequenciamento. A reação de sequenciamento foi realizada segundo o protocolo do fabricante do sequenciador ABI-3730 (Applied Biosystems), em volume final de reação de 10 µL, contendo entre 10 e 30 ng do produto de PCR, 0,5 µM do *primer forward* ou *reverse* do vetor, 1µL de BigDye Terminator v3.1, 5X Sequencing Buffer e 2 µL de BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram submetidos a purificação com SephadexTM G-50 Fine (GE Heatlhcare) e sequenciados no aparelho ABI-3730 (Applied Biosystems). Para análise das sequências foram utilizados os programas SequencherTM (Gene Codes) e BioEdit versão 7.0.5 (Brownlab).

Como só obtivemos clones recombinantes com a sequência do inserto em um sentido, um desses foi utilizado para digestão com a enzima *Eco* RI, liberando o inserto, que foi subclonado no mesmo vetor após ligação com a ligase de DNA T4 (Invitrogen Life Technologies) e usado para transformar *E. coli* DH5α eletrocompetentes. O DNA de 36 clones resultantes foi sequenciado, e se confirmou que três desses tiveram inserção no sentido oposto, como desejado.

Transcrição in vitro de ribossondas para RNA-FISH

Os plasmídios, com segmentos de DNA correspondentes ao transcrito do *FMR1* nos sentidos *sense* ou *antisense*, foram digeridos com a enzima de restrição *XmnI* (New England Biolabs), para linearização; foram então geradas ribossondas marcadas com biotina-16-UTP, por transcrição *in vitro*, utilizando o Biotin RNA Labeling Mix (Roche), 2 U de T7 RNA polimerase (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. Isso foi possível porque o vetor PCR 2.1 TOPO contém, a 3' do sítio de clonagem, um promotor para a polimerase de RNA T7.

A marcação foi verificada por *dot blot*, fixando 2500 a 156 ng de RNA em diluições seriadas de 0,5 x em membrana de nitrocelulose. O RNA marcado com biotina foi identificado por incubação com avidina conjugada a peroxidade e revelação com 4-nitro-azul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP).

Hibridação in situ

Células da granulosa em cultura primária sobre lamínula (3 a 4 dias *in vitro*, div) foram fixadas em paraformaldeído 4% e permeabilizadas com Triton X-100 0,3% em PBS. A pré-hibridação foi realizada a 42 °C por cerca de 4 h, em meio de pré-hibridação (formamida 50%, 1 x solução de Denhardt , 4 × SSC, DTT 10 mM, CHAPS 0,1%, Tween 20 0,1%, tRNA de levedura 500 µg/µL e DNA de esperma de salmão 500 µg/µL). A hibridação foi realizada a 42 °C por aproximadamente 16 h, com 1,5 µg/mL da sonda no meio de pré-hibridação contendo 8% de dextran sulfato. As células foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente com avidina-FITC 1:100 em PBS; em seguida, o material foi desidratado, submergindo a lamínula sequencialmente em banhos de 5 s, em etanol 30%, 50%, 70%, 90% em água DEPC, duas vezes em etanol 100% e duas vezes em tolueno; a lamínula foi montada em lâmina, com Vectashield (Vector) com adição de DAPI 10 µg/ml, para corar os cromossomos. As imagens foram observadas e documentadas em microscópio confocal Zeiss LSM 400.

II.3.9. Estudo da expressão da FMRP pelas HGC por Western blotting

A expressão da FMRP foi analisada por *Western blotting* de lisados de células do líquido folicular. Para obtenção de lisado celular, ressuspendemos o *pellet* de células isoladas do líquido folicular em tampão de lise [NaCl 150 mM, Tris 50 mM, 1x Coquetel Inibidor de Proteinase Celular de Mamíferos (Sigma), $NaVO_4$ 4 mM (inibidor de fosfatase de tirosina) e NaF 1mM (inibidor de fosfatase de serina e treonina)]. Após passagem por seringa de insulina, o lisado foi mantido em gelo por 30 min, sob agitação periódica. Em seguida, foi centrifugado por 20 min, 16.000 x g a 4 ºC e o sobrenadante, utilizado para experimentos de *Western blotting*. Os lisados foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida desmetilante em SDS (SDS-PAGE). Os géis de concentração e separação eram formulados a partir de um estoque de acrilamida:bisacrilamida 30%:0,8% e continham 4% e 10% de acrilamida, respectivamente; ambos continham SDS 0,1%; persulfato de amônia 0,1% e TEMED 0,02%. Para o gel de concentração, foi utilizado Tris 0,013 M, pH 8,8 e para o gel de separação, Tris-HCl 0,04 M, pH 6,8. A eletroforese foi realizada por 4 a 6 h, a 20 mAmp, em tampão Tris 0,025 M, glicina 0,2 M e SDS 0,1%. A transferência para membrana de nitrocelulose com poro 45 µm (GE Life Sciences) foi feita *overnight* a 25 V e 200 mAmp, na presença de glicina 0,23 M e Tris 0,024 M. As membranas foram bloqueadas com caseína 1% (Sigma) em TBS-T (TBS com Tween 20

0,1%), lavadas três vezes por 5 min em TBS-T e incubadas por 1h à TA com anticorpo primário anti-FMRP monoclonal obtido em camundongo (clone 1C3, Chemicon) 1:2000 em TBS-T com albumina bovina (BSA) 5%. Após três lavagens em TBS-T, procedeu-se à detecção com ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante. Como controle de quantidade protéica, após lavagem da membrana, foi utilizado o anticorpo monoclonal para ß-actina [AC-15] conjugado a HRP (Abcam), 1:20.000 em TBS-T com BSA 5%, por 40 min a temperatura ambiente. Procedeu-se à detecção, como descrito acima.

II.3.10. Estudo da localização subcelular da FMRP nas HGC por imunocoloração

Para determinarmos a localização subcelular da FMRP, submetemos as HGC cultivadas a imunocoloração indireta, utilizando anticorpo anti-FMRP. Para a padronização do protocolo, testamos diversos métodos de fixação e determinamos as concentrações dos anticorpos primário e secundário (Zijlstra e col. 1999, Mazroui e col. 2002). O melhor resultado foi obtido quando as células foram cultivadas em lamínulas por três dias e então fixadas em solução de metanol 90% em tampão MES (MES 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM e EGTA 1 mM), por 5 min a -20 ^{o}C. O bloqueio foi feito com SFB 10% em PBS, por 20 min a TA; as células foram então incubadas com o anticorpo anti-FMRP 1C3 Chemicon) 1:400, por 1 h a TA. Após lavagem com PBS, seguiu-se incubação com anticorpo secundário anti-camundongo obtido em asno, conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor 546 (Invitrogen) 1:1000, por 1 hora a TA. Como controle do experimento, utilizamos apenas o anticorpo secundário. Os anticorpos foram diluídos em PBS contendo albumina bovina (BSA) 0,2% e azida sódica 0,03%. Após lavagem, as lamínulas foram montadas em lâmina com Vectashield (Vector Laboratories), contendo DAPI (1:500) e seladas. As imagens foram observadas e documentadas em microscópio confocal Zeiss LSM 400.

II.3.11. Distribuição da FMRP em HGC após indução de estresse oxidativo

Foi demonstrado que após estresse por calor em células HeLa (Mazroiu e col., 2002) e estresse químico em células de hipocampo de camundongo (Kim e col., 2006), a FMRP é deslocada para os grânulos de estresse, evidenciando a participação da FMRP na repressão da tradução na célula submetida a estresse. Para verificarmos a distribuição subcelular da FMRP em células humanas da granulosa submetidas a estresse, realizamos imunofluorescência indireta com marcação dupla com anticorpos anti-FMRP e anti-TIA1 (proteína de ligação a RNA associada a grânulo citotóxico), um marcador de grânulos de estresse (Kedersha e col. 2005). A imunofluorescência indireta foi realizada após submeter células em cultura (6 div) a tratamento com arsenito sódico (200 µM), um indutor de estresse oxidativo, por 10 minutos a 37° C, de acordo com o protocolo de Kim e col. (2006). Em seguida, as células foram fixadas e submetidas ao protocolo de imunocoloração, como descrito acima, para detecção de FMRP. Para detecção de TIA1, utilizamos o anticorpo policlonal anti-TIA1 obtido em cabra (Santa Cruz Biotech) e o secundário anti-cabra obtido em coelho, conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen). As imagens foram observadas e documentadas em microscópio confocal Zeiss LSM 400.

II.3.12. Camundongos

Utilizamos fêmeas de camundongos da linhagem CD1 para a caracterização da expressão do *Fmr1* no ovário murino. Os experimentos com esses animais foram realizados no Laboratory of Reproductive Medicine, Department of OB-GYN, University of South Florida (USF). Os camundongos foram mantidos e tratados de acordo com as normas do NIH e os protocolos, aprovados pelo comitê responsável, o USF Institutional Animal Care and Use Committee (registro USDA # 58-R-0015).

II.3.13. Coleta de MGC e ovócitos

Para a coleta de ovócitos e MGC no oviduto, fêmeas com 14 a 20 dias de vida receberam injeção intraperitoneal de PMSG (gonadotropina sérica de égua grávida, 5 U, Calbiochem) e, após 48 h, injeção de hCG (gonadotropina coriônica humana, 5 IU, Calbiochem). O material foi coletado 14 a 16 h após a última injeção, por dissecção, após sacrifício da fêmea por deslocamento cervical. Os ovidutos foram transferidos para meio KSOM tamponado com Hepes (preparado no laboratório, de acordo com Nagy e col. 2003), e dissecados sob estereomicroscópio para separação dos ovócitos e das MGC. Após três lavagens em gotas de meio e uma quarta lavagem em água, o material foi colocado em meio de lise para extração de RNA (contido no RNeasy Micro Kit, Qiagen) e mantido a -80°C para posterior extração.

II.3.14. Cultivo das MGC

As MGC foram cultivadas em sistema de câmaras de cultura acopladas a lâminas Lab-Tek (Nunc). O meio de cultura era composto de Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM): Ham F12 com Glutamax (Invitrogen Life Technologies), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen Life Technologies) e acrescido de 1% de penicilina/streptomicina (Invitrogen Life Technologies). Depois de semeada, a cultura era mantida a 37°C, 5% de CO_2 por cerca de 30 dias, sem troca de meio de cultivo.

II.3.15. Detecção do transcrito do Fmr1 em MGC e ovócitos de camundongos

A quantidade de células da granulosa obtidas de camundongos é muito menor do que a obtida de mulheres; assim, utilizamos kits para extração de RNA e produção de cDNA específicos para pequenas quantidades de células, tanto para as MGC quanto para os ovócitos.

A extração de RNA de tecidos e células em suspensão foi feita com o RNeasy Micro Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi utilizado como molde em reação de RT-PCR em volume final de 20 µL, na presença de 1 U da enzima Sensiscript RT (Qiagen), do tampão da enzima, 40 U de inibidor de RNase, dNTP 200 µM, *primers* oligo dT 1 µM e *primers* randômicos 10 µM. O mRNA total foi previamente desnaturado por 5 min a

65°C, adicionado ao mix da reação de RT-PCR e incubado por 60 min a 37°C. Utilizamos tanto *primers* do tipo randômico quanto do tipo oligo-dT para termos uma representação mais completa do *pool* de RNA das células. Os oligos dT basicamente iniciam a transcrição reversa de mRNA, que pode ficar limitada à região 3' do transcrito; já os *primers* randômicos também produzem cDNA de RNA ribossômico e transportador, resultando em uma população de cDNA mais abundante e complexa (Shipley, 2006).

O cDNA total foi utilizado para avaliar a síntese de mRNA pelo *Fmr1* nas células-alvo, tendo como controle positivo o cDNA de cérebro de camundongo, em reação de PCR com os *primers* descritos por Willemsen e col. (2003): *forward*, 5'-CAG TTG GTG CCT TTT CTG TAA CT-3'; *reverse*, 5'-GAG ACA ACT TAG TGC GCA GAC T-3'; o produto de 134 pb abrange a junção dos éxons 7 e 8 do gene, que é comum a todos os transcritos. A reação teve volume final de 25 µL, na presença de 75 ng de cDNA de cada tecido, 1 U de Taq polimerase, do tampão da enzima 1 x, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTP 200 µM e 15 pmoles de cada *primer*. O programa do termociclador consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 95° C por 5 min, seguindo-se 34 ciclos iniciados por 30 s de desnaturação a 95° C, diminuindo-se em seguida a temperatura até 60° C por 30 s para a hibridação dos *primers* e aumentando até 72° C para a extensão, e uma etapa final de 72°C por 10 minutos.

II.3.16. Detecção da distribuição subcelular da FMRP nas MGC por imunocoloração

Para imunocoloração, seguimos o protocolo utilizado no Laboratory of Reproductive Medicine, USF (Huang e col. 2008). As células foram fixadas em paraformaldeído 3,7% por 15 min a 4°C, lavadas duas vezes por 15 min com PBS a 4°C, permeabilizadas com Triton-X-100 0,1% em solução de bloqueio (soro de cabra 3%, BSA 0,1% em PBS), por 30 min à temperatura ambiente (TA) e lavadas três vezes em solução de bloqueio (SB) por 15 min. Seguiu-se bloqueio em SB por uma hora à TA e incubação com o anticorpo primário anti-FMRP monoclonal obtido em camundongo (1C3, Chemicon) 1:400, *overnight* a 4° C; após três lavagens por 15 min em SB à TA, procedeu-se à incubação com anticorpo secundário anti-camundongo obtido em cabra associado a Cy3 1:100 em SB, por 1 hora à TA; após três lavagens em SB por 15 min à TA, foi

feita a montagem em lâmina com Vectashield-DAPI. Para imunocoloração de embriões, foi adicionada polivinil pirrolidona (PVP), na concentração final de 0,1% à solução de bloqueio.

II.4 Resultados e discussão

II.4.1. Cultivo das HGC

Teste de viabilidade celular das HGC em suspensão

A estimativa da percentagem de células viáveis nas suspensões de HGC após coloração com azul de tripan foi dificultada, uma vez que as HGC se encontram predominantemente formando agregados. Estimamos a porcentagem de células viáveis antes do plaqueamento com base na coloração dos grumos (Figura II.1), que ficava entre 60 e 70%.

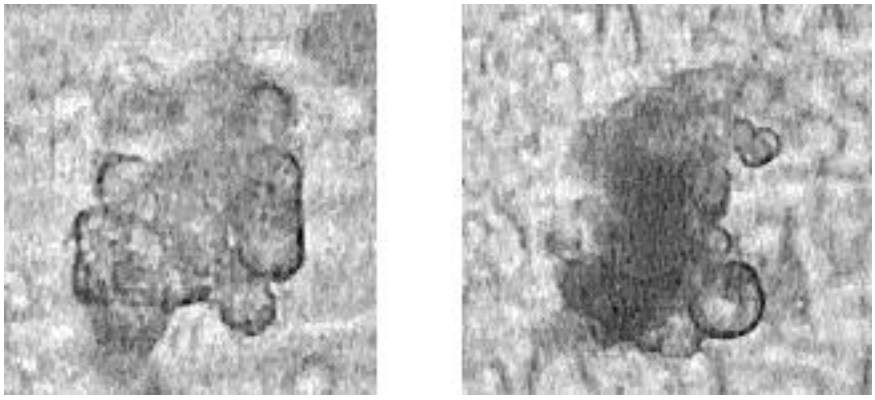

Figura II.1: HGC em suspensão após tratamento com azul de tripan para teste de viabilidade celular. À esquerda, agregado de células viáveis que não foram coradas e, à direta, massa de células preponderantemente inviáveis, que incorporaram o corante.

As HGC em cultura

Observamos que as HGC aderem à superfície do frasco/poço de cultura cerca de 4 h após o plaqueamento (Figura II.2). As células crescem a partir dos grumos lentamente, mas após um dia em cultura já se observam células com aspecto fibroblastóide (Figura II.3); hemácias também são observadas na cultura. As HGC aos três div apresentam-se alongadas, com um grande núcleo central e citoplasma granuloso (Figura II.4). Tais características correspondem às descritas por Quinn e col. (2006).

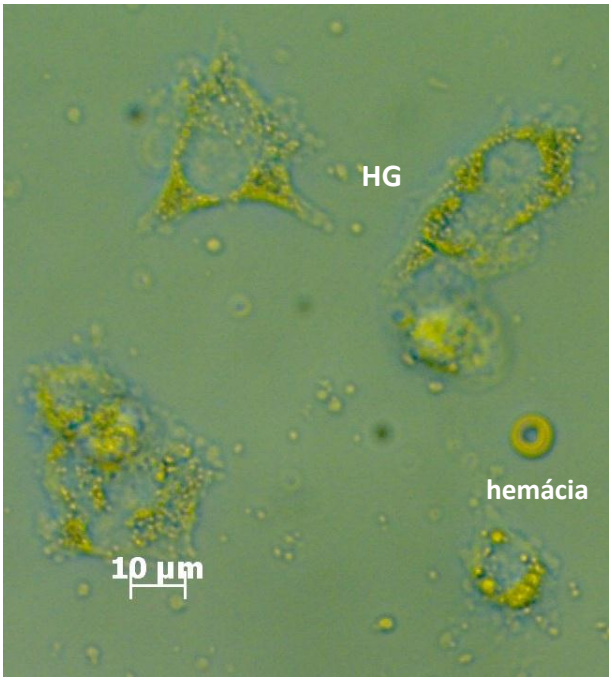

Figura II.2: As HGC, isoladas de acordo com Protocolo 1, em cultura, quatro horas após plaqueamento, aderem à superfície da placa e têm formato globular. As HCG são as células arredondadas maiores, agrupadas ou isoladas. A célula arredondada menor e isolada é uma hemácia.

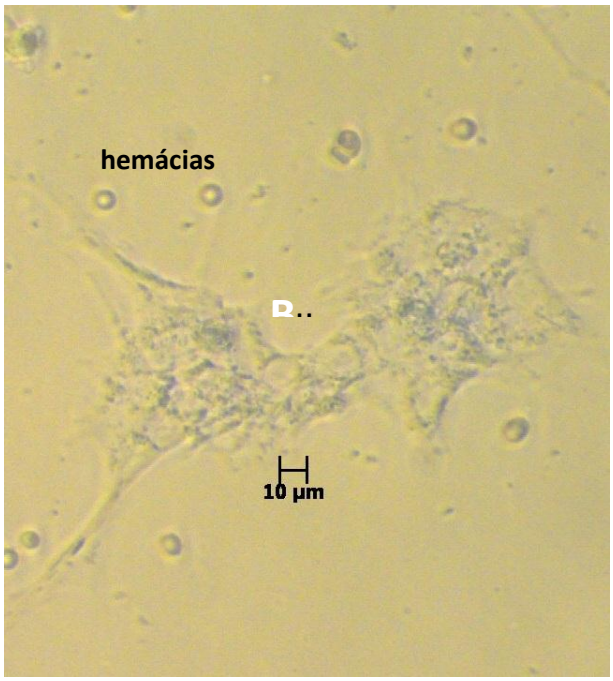

Figura II.3: As HGC, isoladas de acordo com Protocolo 2, em cultura, 24 horas após plaqueamento, assumem formato fibroblastóide e os grânulos lipídicos ficam visíveis. As células arredondadas menores e isoladas são hemácias.

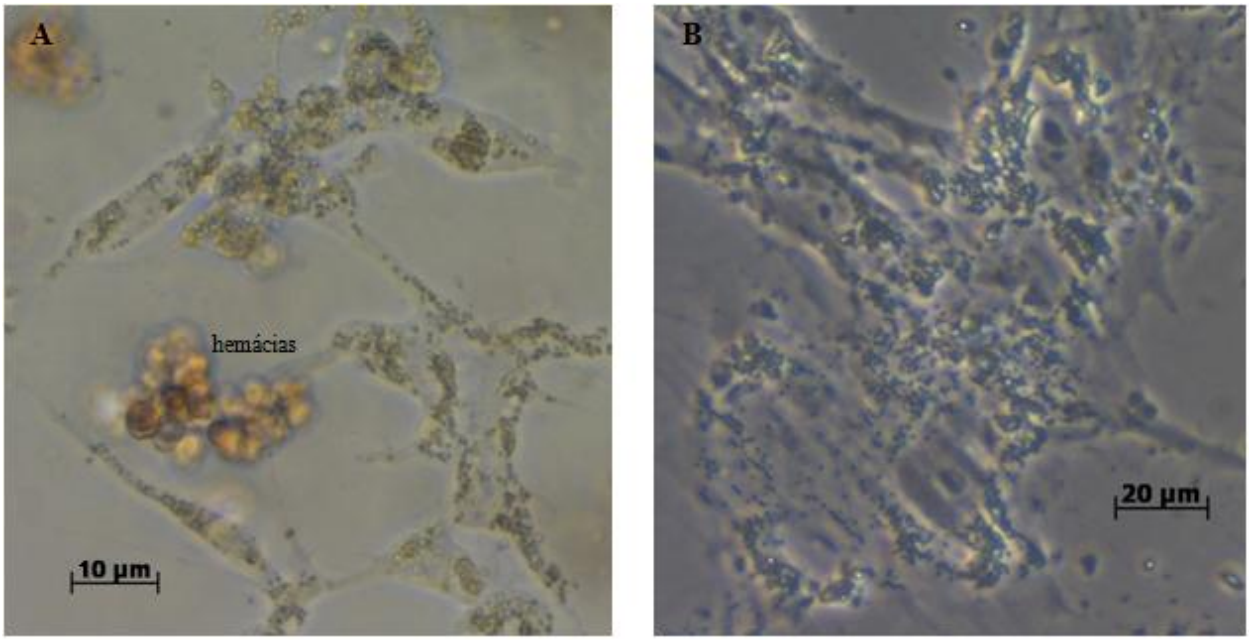

Figura II.4: As HGC, após três dias de cultivo, apresentam-se alongadas, com o citoplasma granuloso que lhe é típico. (A) As HGC foram isoladas segundo o Protocolo 2; observam-se hemácias, formando um grupo de células menores e arredondadas. (B) As HGC foram isoladas de acordo com o Protocolo 3; não se observam hemácias.

II.4.2. Caracterização das HGC

Composição dos grânulos citoplasmáticos das HGC

A coloração com o corante lipofílico DiI conjugado à rodamina confirmou a natureza lipídica dos grânulos citoplasmáticos (Figura II.5A). A composição lipídica dos grânulos é condizente com a elevada síntese de esteróis pelas HGC (Junqueira e Carneiro, 2004).

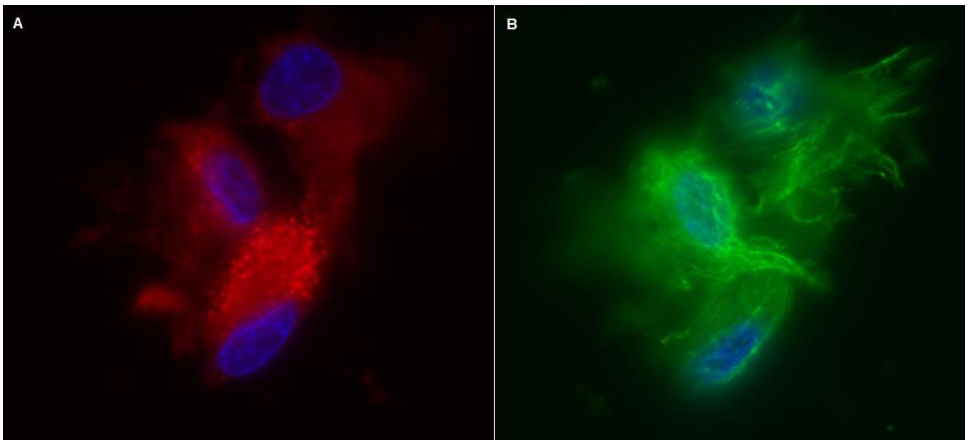

Figura II.5: HGC, após seis dias de cultivo. (A) A coloração com DiI revela a natureza lipídica dos grânulos (pontilhado vermelho), cuja posição citoplasmática é confirmada (B) pela imunocoloração com anticorpo anti-α-tubulina e anticorpo secundário conjugado a FITC (verde). Em (A) e (B), os núcleos das células são evidenciados pela coloração com DAPI (azul). Objetiva: 63x.

Os marcadores de HGC em células isoladas do líquido folicular

Demostramos que as células isoladas do líquido folicular produzem os transcritos dos receptores de hormônio folículo-estimulante (FSHR) e de hormônio luteinizante e gonadotrofina coriônica (LHCGR), marcadores de HGC (Figura II.6), o que não foi observado para a linhagem imortalizada de células derivadas de rins embrionários humanos (HEK293), nosso controle negativo.

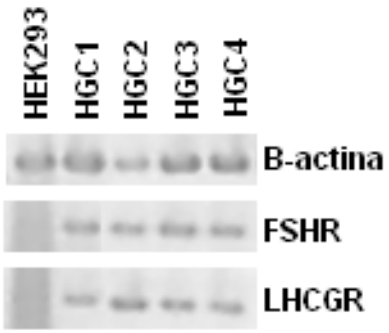

Figura II.6: Expressão de mRNA de FSHR e LHCGR pelas células do líquido folicular. Os produtos de PCR, obtidos após extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação com *primers* desenhados para os transcritos de β-actina (controle positivo da PCR), FSHR e LHCGR (marcadores de HGC), foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% , por 30 min, 100 V. As pistas mostram, da esquerda para a direita, produtos das reações que tiveram como molde cDNA de células da linhagem HEK293 (controle); e de quatro amostras de HGC (1 a 4).

Quinn e col. (2006) também demonstraram que as células obtidas do aspirado folicular expressam mRNA de marcadores das HGC. Submeteram as amostras de células isoladas do líquido folicular a tratamento com anticorpos específicos para HGC e também com anticorpos para linfócitos, monócitos e neutrófilos, para análise por citometria de fluxo. Cerca de 80% das células foram positivas para os marcadores de HGC, enquanto menos de 0,5 % e 0,75% foram positivas para os marcadores de linfócitos T e B, respectivamente e menos de 2 %, para marcadores de neutrófilos e monócitos. Essas células sanguíneas, entretanto, não aderem à superfície dos frascos de cultura e são assim eliminadas nas condições de cultivo das HGC.

II.4.3. Análise da expressão do gene FMR1 em células ovarianas

A expressão do mRNA do gene FMR1 em células da granulosa e em ovócitos

Demonstramos, por RT-PCR, que ocorre expressão do gene *FMR1* pelas HGC, isoladas do líquido folicular (Figura II.7), e pelas MGC, coletadas no oviduto (Figura II.8).

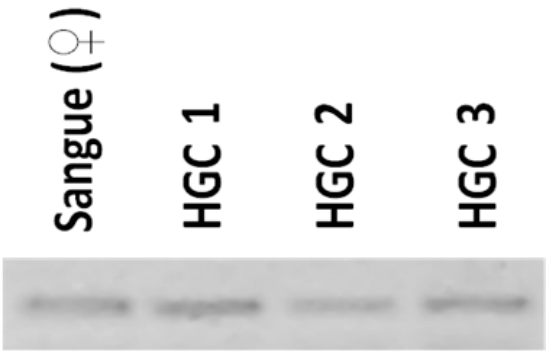

Figura II.7: Detecção do mRNA do gene *FMR1* nas HGC. Produtos de PCR obtidos após a extração do RNA, produção de cDNA por RT-PCR e amplificação com *primers* desenhados para o exon 7 (*forward*) e 8 (*reverse*) do transcrito do *FMR1,* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% , por 30 min, 100 V. Pista 1, produto obtido a partir de RNA extraído de células de

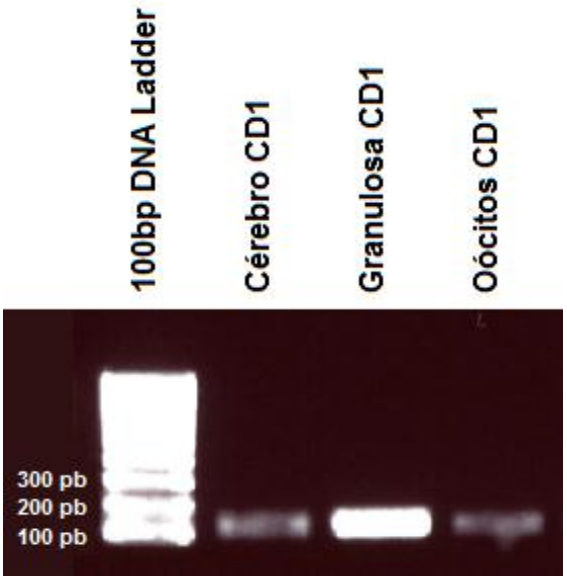

Figura II.8: Detecção do mRNA do gene *Fmr1* em células da granulosa, ovócitos e cérebro (controle) de fêmeas WT da linhagem de camundongos CD1. Eletroforese, em gel de agarose 2%, dos produtos de PCR, utilizando como molde 75 ng de cDNA de cérebro, de células da granulosa e de ovócitos. Eletroforese: 25 min; 80 V.

No banco de dados eletrônico GeneCards, consta que a expressão do *FMR1* foi detectada em tecido ovariano humano por *array* de expressão e *Northern* eletrônico, porém não há descrição na literatura da expressão do RNA do *FMR1* pelas células da granulosa no ovário adulto de mamíferos.

Bachner e col. (1993), utilizando hibridação *in situ* de RNA, relataram que o sinal de hibridação correspondente ao mRNA do *Fmr1* é ubíquo em fetos e adultos de camundongos, porém estando aumentado no ovário fetal, no estágio em que ocorre a proliferação das ovogônias. Já no ovário murino maduro, os autores não observaram sinal de hibridação aumentado em nenhum tipo celular específico. Além de detectarmos a expressão do mRNA do *FMR1* nas HGC compatível com a expressão no sangue, nossa análise, não quantitativa, do cDNA obtido a partir do RNA de MGC, de ovócitos e de cérebro de fêmeas de camundongo adultas, foi sugestiva de que a expressão do mRNA do *Fmr1* é maior nas MGC, quando comparadas a ovócitos e cérebro. Atribuímos essa divergência, em relação ao observado por Bachner e col. (1993), ao fato de as análises terem sido feitas em momentos distintos do ciclo estral, por meio de técnicas diferentes: enquanto Ba chner e col. (1993) analisaram folículos imaturos por hibridação *in situ*, comparando a intensidade de sinal de hibridação nos tecidos, nós utilizamos o cDNA das MGC e de ovócitos coletados após a ovulação, como molde para RT-PCR, comparando visualmente a intensidade da banda dos produtos da PCR, após eletroforese

em gel de agarose. Considerando que a expressão da Fmrp está aumentada nas MGC dos folículos em crescimento, quando comparadas àquelas dos folículos imaturos (Bakker e col. 2000), seria esperado que houvesse um aumento da expressão do mRNA do *Fmr1* nessas células no período pós-ovulatório, especialmente sob condições de estímulo da ovulação, como foi o caso deste estudo.

A distribuição subcelular do mRNA do FMR1 nas HGC (RNA-FISH)

Os sinais de hibridação da ribossonda complementar ao mRNA do *FMR1* (*antisense)* em HGC cultivadas apareceram consistentemente nos núcleos de praticamente todas as células, concentrados em uma ou mais regiões arredondadas e, no citoplasma, além de uma marcação difusa, foram visualizadas regiões com sinais mais nítidos de hibridação (Figuras II.9 A e II.10 C). Este experimento foi repetido em HGC precedentes de quatro pacientes diferentes e em fibroblastos. Testamos também conjugados fluorescentes distintos e marcações de sondas em dias diferentes.

O padrão de concentração dos fortes sinais de hibridação da ribossonda nos núcleos nos levou à hipótese de que as regiões de hibridação fossem nucléolos.Testamos essa hipótese com base em propriedades das colorações do nucléolo por iodeto de propídio (PI) e por DAPI, um corante que tem afinidade por DNA rico em AT. Em células HeLa, a região do núcleo interfásico que possui sinal de hibridação após imunocoloração com anticorpo para o fator de transcrição ribossomal UBF (***U****pstream* ***B****inding* ***F****actor*), não é corada pelo DAPI, indicando que este não cora rDNA (Gasiorowski e Dean, 2007). Quanto à coloração por PI, em *Xenopus*, foi observado que a coloração por PI de células interfásicas, submetidas a procedimentos que não utilizam sondas marcadas com biotina, produz forte fluorescência vermelha no nucléolo e moderada, no restante do núcleo. Já em células submetidas a procedimentos de hibridação *in situ*, utilizando sondas marcadas com biotina e detectadas com avidina, o PI produz coloração brilhante, em todo o núcleo (Wu e Gall, 1997). Assim, para avaliarmos se o sinal de hibridação no núcleo corresponde ao nucléolo, comparamos a coloração do núcleo, nas HGC, que foram tratadas com DAPI e PI e que foram submetidas ao protocolo de RNA-FISH, com e sem incubação com ribossonda marcada com biotina e detectada com avidina-FITC (Figura II.10). As regiões dos núcleos das HGC não coradas pelo DAPI corresponderam àquelas coradas intensamente pelo PI, nas células não incubadas com a sonda, uma confirmação de que as regiões não coradas pelo

DAPI nas HGC são nucléolos (Figura II.10. D e E). Os sinais de hibridação da ribossonda do mRNA do *FMR1* colocalizaram-se com as regiões não coradas pelo DAPI, uma indicação de sua localização nucleolar (Figura II.10, A e C).

Submetemos também fibroblastos cultivados de uma mulher normal ao protocolo de RNA-FISH, com resultado semelhante àquele que obtivemos com as HGC (Figura II.9 C). Assim, a provável localização nucleolar da *FMR1* não está restrita às HGC.

Tassone e col. (2004b), por hibridação *in situ* de ribossonda mRNA do *FMR1*, em núcleos isolados de neurônios do córtex frontal de cérebro *post-mortem* de um afetado por FXTAS, portador de pré-mutação com repetição $(CGG)_{113}$ e nível de mRNA do *FMR1* no sangue 3,8 vezes maior do que indivíduos normais, detectaram o mRNA do *FMR1* em uma estrutura nuclear, com sinal semelhante ao que encontramos nos núcleos das HGC e dos fibroblastos; essas estruturas foram visualizadas em algumas células e interpretadas como as inclusões intranucleares observadas anteriormente em neurônios de afetados por FXTAS. Descartamos a possibilidade de que as estruturas que visualizamos sejam essas inclusões intranucleares, pois além de serem observadas consistentemente nas células em que analisamos, foram observadas em HGC de quatro mulheres e nos fibroblastos de uma outra. A presença de pré-mutação, relacionada às inclusões intranucleares, em todas elas é improvável, considerando-se que a frequência estimada de pré-mutação é de 1:250 mulheres da população geral. De qualquer maneira, essa possibilidade foi afastada para três das quatro mulheres cujas HGC foram analisadas. A análise da repetição $(CGG)_n$ do gene *FMR1* em DNA obtido das HCG, por PCR, usando-se os *primers* c e f (Fu e col. 1991) revelou nelas dois alelos $(CGG)_n$ não pré-mutados. Numa quarta amostra, apenas um alelo foi amplificado, não sendo assim possível distinguir entre a homozigose quanto a alelos comuns ou a heterozigose quanto a um alelo com a repetição expandida, o que impede sua amplificação por PCR.

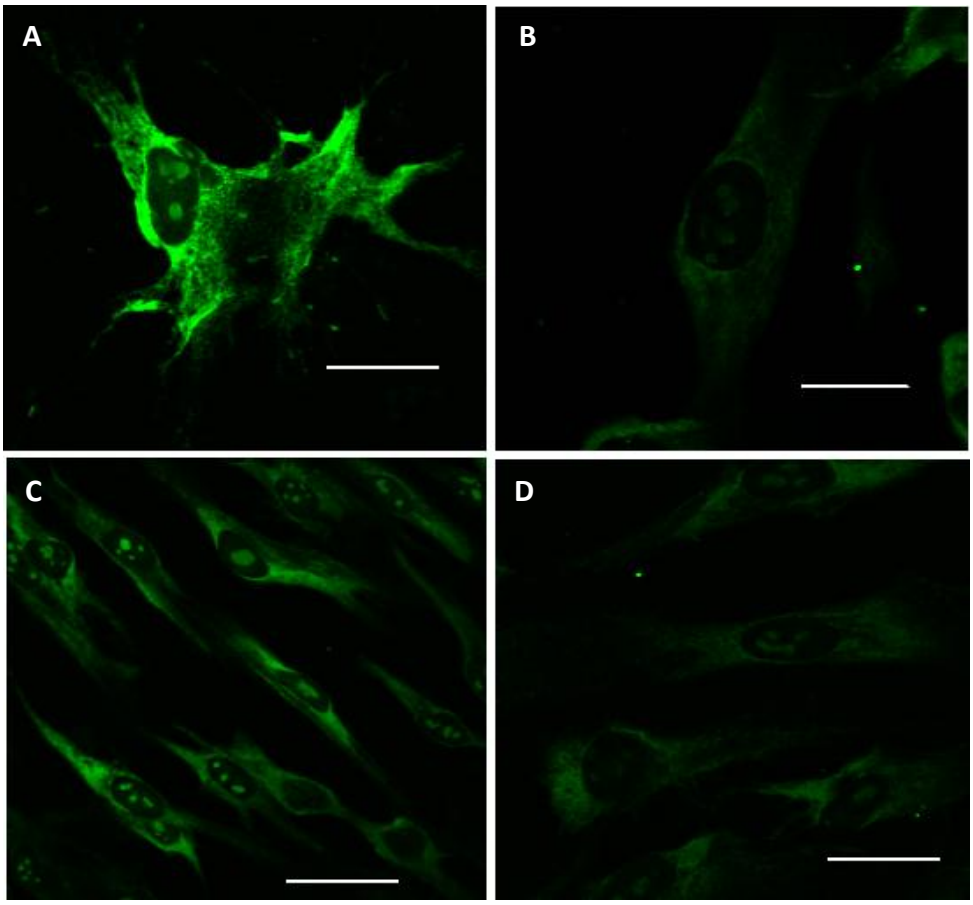

Figura II.9: Localização, por hibridação *in situ* fluorescente, do transcrito do *FMR1* (A,B) nas HGC cultivadas por cinco dias e (C,D) em fibroblastos, cultivados até atingirem confluência. A ribossonda complementar (*antisense*) a segmento do mRNA do FMR1 foi marcada com biotina e detectada com avidina-FITC. (A, C) Nos núcleos os sinais de hibridação da sonda *antissence* aparecem concentrados em uma ou mais regiões arredondadas; a marcação citoplasmática é difusa, com regiões de sinais mais intensos. (C, D) A hibridação da sonda *sense* gerou marcação de baixa intensidade nas mesmas estruturas. Microfotografia obtida em microscópio confocal. Barras: 25 µm.

Deve ser salientado o fato de que Tassone et al (2004b), usando RNA-FISH em núcleos isolados de neurônios, tenham detectado a localização nuclear do mRNA do *FMR1* apenas em algumas células. Mesmo que tenham interpretado erroneamente as estruturas em que se concentraram os sinais de hibridação e que estas fossem, na verdade, nucléolos, os resultados diferem dos nossos, pois nas HGC e nos fibroblastos o mRNA foi detectado consistentemente nos núcleos. Assim, a presença nucleolar do mRNA pode ser uma característica de certos tecidos ou mesmo de células cultivadas em proliferação.

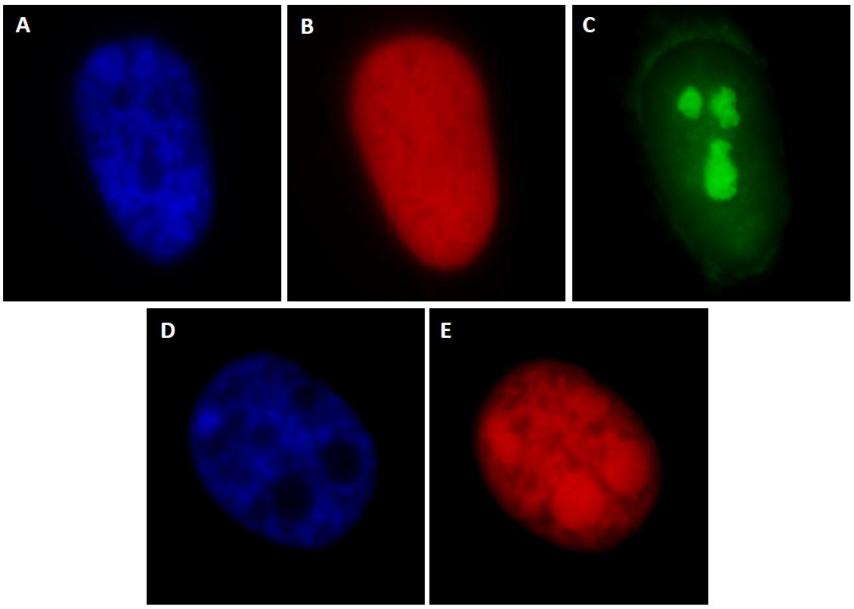

Figura II.10: Identificação da estrutura nuclear em que o mRNA do *FMR1* foi localizado por FISH. A, B e C, núcleo de HGC hibridado com ribossonda *antisense* marcada com biotina e detectada por avidina-FITC; D e E, núcleo, submetido ao protocolo de RNA-FISH, mas não incubado com a ribossonda. A e D, coloração com DAPI, B e E coloração com PI e C, RNA-FISH. Em A e D observam-se regiões não coradas pelo DAPI, correspondentes aos nucléolos. Em B, o núcleo se apresenta uniformemente corado pelo PI. Em E, as regiões com coloração vermelha mais intensa do PI correspondem às regiões não coradas pelo DAPI, validando a interpretação de que são nucléolos. Em (C), os sinais de hibridação da ribossonda colocalizam-se com as regiões não coradas pelo DAPI em A, indicando sua localização nucleolar (Para detalhes, ver o texto)

O nucléolo é um compartimento nuclear com função bem definida na transcrição de RNA ribossômico e na organização das subunidades ribossômicas. Adicionalmente, participa da montagem de ribonucleoproteínas não ribossômicas que são destinadas ao transporte de RNA ao citoplasma; essas partículas são denominadas ribonucleoproteínas mensageiras (mRNP) (revisão em Kiebler e col. 2005 e Jellbauer e Jansen, 2008). Assim, o transcrito do *FMR1* pode estar constituindo mRNP no nucléolo, para seu direcionamento a sítios citoplasmáticos específicos, onde ocorrerá sua ancoragem e modulação da tradução.

A própria FMRP e as proteínas relacionadas a ela (***F**ragile-**X** **R**elated **P**roteins*, FXR1P e FXR2P) participam de mRNP e têm presença transiente no núcleo. A FXR2P e determinadas isoformas da FXR1P, que contêm sinal de direcionamento nucleolar, trafegam entre o citoplasma e o nucléolo, enquanto a FMRP trafega entre o citoplasma e o nucleoplasma, embora, em raros casos, a FMRP tenha sido visualizada no nucléolo; assim, por utilizarem rotas moleculares diferentes, as proteínas FXR atuariam no transporte de diferentes RNA ou direcionariam os mesmos RNA a diferentes componentes celulares (Tamanini e col. 1999 a e b, e 2000). Por outro

lado, os autores realizaram essas análises a partir da superexpressão de transcritos para as três proteínas da família. Experimentos com as proteínas recombinantes como nesses têm sido necessários à demonstração da localização nuclear. Nesse sentido, nossos resultados de RNA-FISH com ribossondas específicas ao *FMR1* trazem resultados inovadores em relação à localização do mRNA do *FMR1* no nucléolo.

A expressão da FMRP nas HGC

A análise dos lisados provenientes das HGC isoladas do fluido folicular, por eletroforese em gel SDS-PAGE e Western *blotting*, mostrou que essas células expressam várias isoformas da FMRP (Figura II.11, pistas 2, 3 e 4), com massa molecular entre 60 e 95 kDa. Como controle positivo para a expressão da proteína, utilizamos lisado de córtex cerebral de rato, 10 dias pós-natal (P10) (Figura II.11, pista 1). Observamos que as HGC durante a ovulação/hiper-ovulação apresentam níveis elevados de expressão das principais isoformas da FMRP, que não diferem visualmente daqueles da Fmrp de cérebro de rato. Embora os níveis de expressão da FMRP tenham variado – por exemplo, quando se comparam as amostras 2 e 3 – a proteína está presente de forma considerável nessas amostras. Essa variação pode se dever a diferenças de representação de HGC nos aspirados de líquido folicular ou a uma real diferença de expressão inerente às amostras. Recentemente, Schuettler e col. (2011) mostraram, por imunoistoquímica, que a FMRP está presente nas células da granulosa de folículos imaturos humanos.

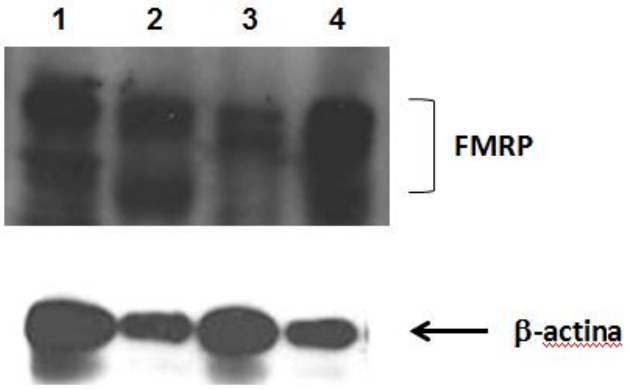

Figura II.11: Western *blot*: lisado celular de cérebro de rato (pista 1) e HGC (pistas 2, 3 e 4), contendo 50 - 80 µg de proteína total; foi utilizado o anticorpo primário anti-FMRP monoclonal e o secundário anti-camundongo conjugado à HRP. Como controle, o anticorpo anti-β-actina-HRP. As HGC expressam várias isoformas da FMRP, com massa molecular variando entre 60 e 95 kDa, não parecendo diferir do observado para a Fmrp de cérebro de rato.

Distribuição subcelular da FMRP em células da granulosa

A imunocoloração com anticorpo anti-FMRP revelou boa intensidade de sinal da proteína distribuída de forma dispersa, em grânulos finos, no citoplasma das HGC e nas MGC (Figuras II.12 e 13).

Nos filopódios das MGC, observamos marcação concentrada em alguns pontos, mas com diâmetro aparentemente maior que o pontilhado citoplasmático (Figura II.12 B, setas). Esse tipo de distribuição é semelhante ao padrão de distribuição da Fmrp observado em espinhas dendríticas de neurônios de hipocampo de rato em cultura primária (Castrén e col. 2001). Essas granulações nos neurônios vêm sendo denominadas grânulos de RNA, grânulos neuronais ou corpúsculos p. Embora a distinção entre esses corpúsculos citoplasmáticos não seja inteiramente clara, havendo alguma sobreposição em sua composição molecular, e dificuldade na nomenclatura, essas estruturas que contém partículas ribonucleoprotéicas, componentes do complexo de iniciação de tradução e degradação de RNA, promovem o transporte de mRNA através dos dendritos e, ao atingirem as espinhas dendríticas, são responsáveis pela estabilidade desses mRNA e pelo controle da tradução (Levenga e col. 2009). A distribuição da proteína nas MGC, formando grânulos grosseiros, similarmente, pode refletir a atuação da Fmrp no transporte de mRNA e na modulação da tradução em células ovarianas.

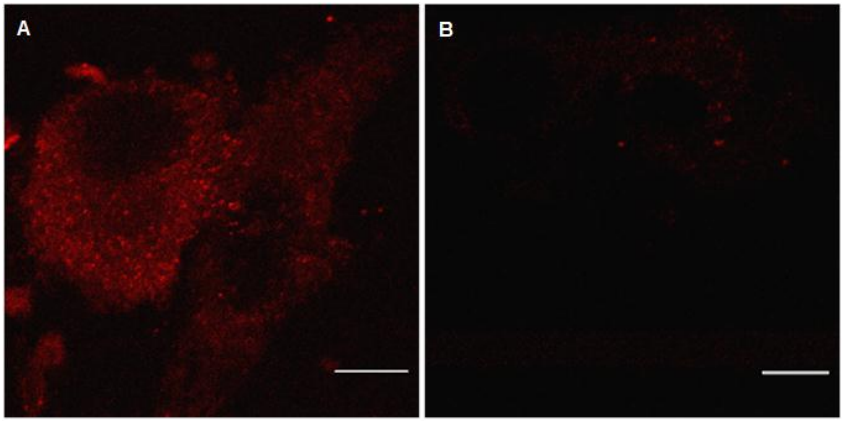

Figura II.11: Localização da FMRP em células da granulosa humana, cultivadas por três dias, após imunofluorescência indireta. (A), HGC, tratadas com anticorpo anti-FMRP obtido em camundongo e anticorpo secundário anti-camundongo obtido em asno conjugado ao fluorocromo Alexa 546; a proteína fica dispersa no citoplasma, formando grânulos finos, em vermelho. (B) Controle negativo somente com o anticorpo secundário conjugado a Alexa 546. Barra = 5 µm.

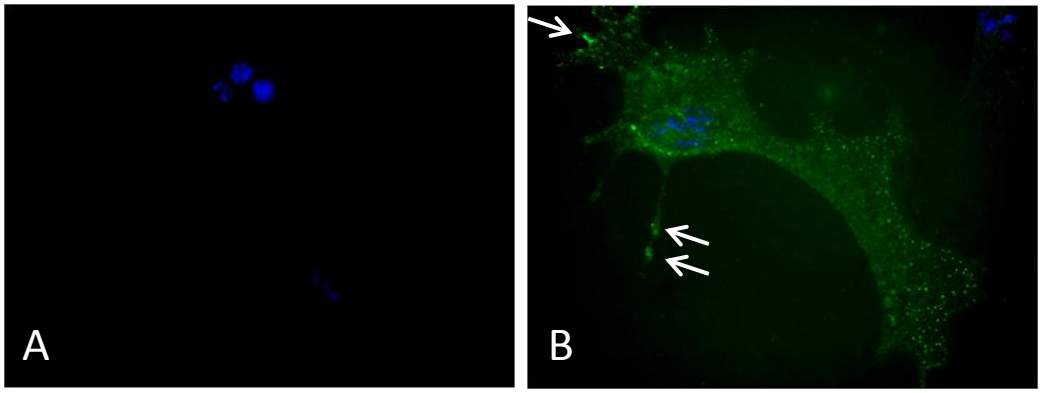

Figura III.12: Localização da Fmrp em célula cultivada da granulosa de fêmea da linhagem de camundongo C57. (A) MGC tratada somente com anticorpo secundário conjugado a FITC. (B) MGC tratada com anticorpo primário anti-FMRP (1C3) e anticorpo secundário ligado a FITC; a marcação revela a distribuição da Fmrp dispersa no citoplasma. Em algumas projeções da membrana plasmática, filopódios, na região apical da MGC, observa-se marcação concentrada em alguns pontos, numa granulação mais grosseira (setas). Em azul, cromatina corada com DAPI.

Em camundongos transgênicos, a proteína de fusão do transgene *FMR1*/lacZ foi encontrada nas células da granulosa de folículos ovarianos imaturos (Hergersberg e col. 1995). Em humanos, foi detectada, por imunohistoquímica, a presença da FMRP nas HGC de folículos imaturos (Schuettler e col. 2011). Em camundongos, Bakker e col. (2000), também por imunohistoquímica, demonstraram que a Fmrp está presente no citoplasma do óvulo, na zona pelúcida, na região antral e nas células da granulosa dos folículos em crescimento.

Nossas observações, em células da granulosa coletadas após hiperestímulo da ovulação, estão de acordo com os dados da literatura, que indicam que o gene *FMR1* deve estar inativo ou ter expressão basal nos folículos ovarianos de mamíferos até o seu recrutamento, quando passa novamente a ter expressão significativa.

II.4.4. A localização da FMRP nas HGC após estresse oxidativo

Após o tratamento com arsenito sódico, que induz o estresse oxidativo, a FMRP deixou de ter distribuição citoplasmática difusa e passou a apresentar-se em grânulos perinucleares (Figura II.10 B), colocalizando-se com TIA1 (Figura II.13 C e D). Essa observação sugere que, nas HCG, mecanismo(s) relacionado(s) ao estresse químico deve(m) controlar a distribuição

subcelular da FMRP, à semelhança do que foi observado em células HeLa (Mazroiu e col. 2002) e no hipocampo de roedores (Kim e col. 2006).

Os grânulos de estresse são *foci* citoplasmáticos nos quais mRNA não traduzidos se acumulam, quando as células são submetidas a diversos estresses ambientais, induzindo a parada da tradução (revisão em Spector 2006). Após submeterem células HeLa à temperatura de 43ºC por 30 min, Mazroui e col. (2002) detectaram a presença da FMRP em grânulos de estresse, em contraste com a localização citoplasmática nas células mantidas a 37ºC. Em ambas as situações, a FMRP colocalizava-se com RNA contendo poli(A) porém, quando nos grânulos, não se observava colocalização com a proteína ribossomal L7, indicando a parada na tradução desses RNA associados à FMRP. De fato, após sedimentação em gradiente de densidade de sacarose e análise da distribuição da FMRP por *immunoblotting*, menos de 10% da FMRP foram detectados nos polirribossomos nas células submetidas ao calor, quando comparadas ao controle (Mazroui e col. 2002).

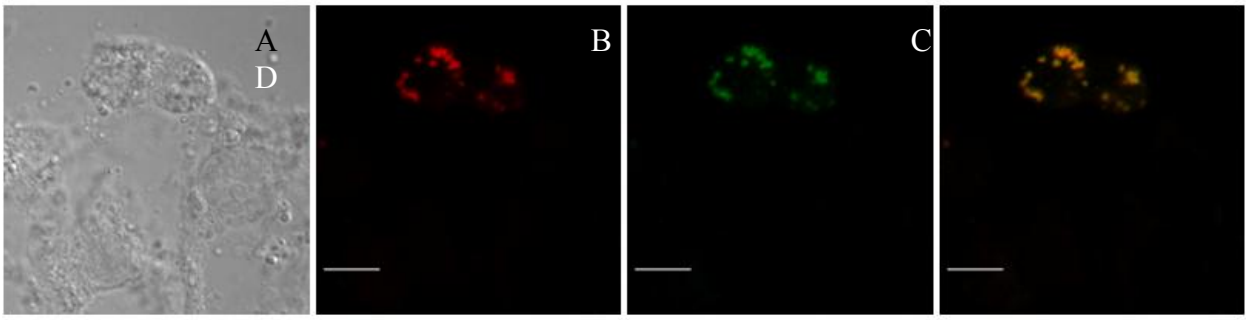

Figura II.13: HGC, cultivadas por seis dias e tratadas com arsenito sódico, seguindo-se imunofluorescência indireta para detecção de FMRP e TIA-1. (A) Células em contraste de fase. (B) Células tratadas com anticorpo anti-FMRP obtido em camundongo e anticorpo secundário anti-camundongo obtido em asno conjugado ao fluorocromo Alexa 546. (C) Células tratadas com anticorpo anti-TIA1 obtido em coelho e anticorpo secundário anti-coelho obtido em cabra conjugado ao fluorocromo Alexa 430. (D) Sobreposição das imagens A e B, mostrando, em laranja, a colocalização das duas proteínas, após indução de estresse oxidativo. Barra = 10 µm.

Em ratos, a FMRP e seus mRNAs associados também são deslocados dos polirribossomos para os grânulos de estresse nos neurônios do hipocampo submetidos a estresse, seja eletrofisiológico, por descarga elétrica aplicada no hipocampo *in vivo* (Mazroui e col. 2002), ou oxidativo, por tratamento do tecido com arsenito sódico (Kim e col. 2006). Esses resultados apoiam a hipótese de que a FMRP participa do mecanismo transitório de parada da tradução após estresse (Mazroui e col. 2002).

CAPÍTULO III

Estudo do início do desenvolvimento de embriões de fêmeas *knock in* (KI) quanto à pré-mutação do gene *Fmr1* e tentativa de derivação de células tronco embrionárias KI

III.1. Introdução

O gene *Fmr1* de camundongo apresenta identidade de sequência de 96% com seu ortólogo em humanos (Ensembl Genome Browser), sendo 95% na região codificadora; a identidade de aminoácidos entre as proteínas é de 97% (Ashley e col. 1993). Ambos os ortólogos contêm 17 exons, porém o gene murino tem 16 transcritos alternativos identificados, sendo nove deles codificadores de proteínas, um transcrito processado em quadro de leitura, que não teve proteína correspondente encontrada *in vivo*, e seis transcritos não codificadores que retêm sequências intrônicas. Já o *FMR1* humano tem 13 transcritos alternativos identificados, dos quais oito codificam proteína e cinco não são codificadores e retêm sequências intrônicas (Ensembl Genome Browser, 24/03/2011). A repetição na região 5' não traduzida do *Fmr1* apresenta geralmente oito trincas CGG e uma CGA [$(CGG)_6$ CGA $(CGG)_2$] (Ashley e col. 1993) e não há relato de expansão da repetição ocorrendo naturalmente em camundongos.

Modelos murinos são amplamente utilizados no estudo de mecanismos patológicos de doenças humanas. Com a finalidade de desvendar o mecanismo de expansão da repetição CGG e os efeitos da pré-mutação do *FMR1*, no desenvolvimento e no funcionamento de neurônios, que levam à FXTAS, foram geradas linhagens de camundongos nas quais as repetições CGG, que geralmente são de 8 a 10, foram substituídas por repetições na faixa da pré-mutação humana, em torno de $(CGG)_{\sim 98}$ (Bontekoe e col. 2001, Entezam e col. 2007). Por serem portadoras de pré-mutação e não de mutação completa, essas linhagens são denomimadas *knock in* (KI).

Bontekoe e col. (2001) geraram um modelo murino de pré-mutação do *FMR1* para estudo da instabilidade da repetição CGG na transmissão. A expansão da repetição CGG ocorreu em 8,4% das transmissões, de $(CGG)_{98}$ para no máximo $(CGG)_{108}$, porém os camundongos KI apresentaram muitas das características observadas em humanos portadores de pré-mutação. Nos camundongos adultos pré-mutados, assim como em humanos, podem ocorrer aumento na expressão do mRNA do *FMR1*, leve diminuição dos níveis da FMRP, neurodegeneração e inclusões intranucleares em neurônios e células da glia (Willemsen e col. 2003 Brouwer e col. 2008, Hunsaker e col. 2009, Wenzel e col. 2009). Nessa linhagem de camundongos KI, também foram descritas deficiências morfológicas e funcionais precoces que antecedem a neurodegeneração, indicando que os impactos da pré-mutação no sistema nervoso central podem estar presentes desde os primeiros estágios do desenvolvimento (Chen e col. 2010).

A linhagem de camundongos KI quanto ao *Fmr1* produzida por Entezam e col. (2007) revelou-se um bom modelo para estudo da instabilidade das repetições, com a ocorrência de grandes expansões para a mutação completa em uma única geração. Além disso, compartilha características da pré-mutação com humanos, como a relação direta entre o número de repetições e o nível de mRNA do *Fmr1* no sangue periférico; também, a diminuição do nível da Fmrp está associada com aumento da frequência de anomalias e queda no número de células de Purkinje. O déficit no nível da Fmrp nesses camundongos varia em diferentes partes do cérebro e é mais acentuado em regiões que podem ser responsáveis por sintomas da mutação completa que podem estar presentes em portadores de pré-mutação, como ansiedade, transtorno obsessivo compulsivo e autismo.

Em nosso estudo da expressão do gene *FMR1* no ovário, idealmente deveríamos comparar portadoras da pré-mutação com não portadoras. Não houve, entretanto, procedimento de fertilização *in vitro* em portadora de pré-mutação, que nos permitisse acesso a células pré-mutadas de granulosa. Assim, procuramos realizar esse estudo comparativo num modelo animal. Tivemos acesso a animais da linhagem de camundongos KI, obtida por Entezam e col. (2007), que foram enviados pela *Gene Structure and Disease Section* do *National Institutes of Health* (NIH) para a *University of South Florida* (USF), onde o Dr. David L Keefe nos disponibilizou o uso do biotério e das instalações do *Laboratory of Reproductive Medicine* no *USF College of Medicine*. Após dois meses de trabalho nos EUA, fomos informados que estudos do *Fmr1* no

ovário de fêmeas KI estavam em andamento no NIH e que estávamos, na verdade, autorizadas a obter linhagem de células tronco embrionárias e nelas realizar o estudo do *FMR1*.

III.2. Objetivos

Nosso objetivo inicial era o estudo comparativo da expressão do gene *Fmr1* e da distribuição subcelular de seu mRNA e da Fmrp, em células da granulosa e em ovócitos de fêmeas de camundongo KI quanto à prémutação *Fmr1* e fêmeas selvagens (WT). Na impossibilidade de realizar tal estudo com os animais KI colocados à nossa disposição, nosso objetivo foi modificado para a obtenção de linhagem de células tronco embrionárias (***E**mbryonic **S**tem **C**ells*, ESC) de camundongo KI quanto ao *Fmr1*, para estudar a expressão do gene nessa linhagem em comparação com linhagem de células tronco obtida de animal WT, inclusive durante a diferenciação.

III.3. Material e Métodos

III.3.1. Camundongos

Os camundongos KI quanto ao *Fmr1* foram descritos por Entezam e col. (2007); esses animais pertencem à linhagem C57/BL6 e os indivíduos KI fundadores continham $(CGG)_{\sim 118}$. Foram enviados, do *Gene Structure and Disease Section* do *National Institutes of Health* (NIH) para a *University of South Florida* (USF), quatro camundongos KI, sendo dois machos e duas fêmeas. Camundongos WT da linhagem C57, disponíveis na USF, foram utilizados nos cruzamentos e nas comparações entre indivíduos KI e normais. Os fibroblastos embrionários, utilizados como células *feeder* nos experimentos com ESC, foram isolados a partir de camundongos WT da linhagem CD1.

Os animais foram mantidos e tratados de acordo com as normas do NIH e os protocolos, aprovados pelo comitê responsável, o USF Institutional Animal Care and Use Committee (Registro USDA # 58-R-0015).

III.3.2. Genotipagem para identificação dos camundongos portadores do alelo KI

Os camundongos KI fundadores foram cruzados com camundongos WT, para obtermos maior número de animais KI. Para identificação dos animais KI, a genotipagem dos camundongos foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Lavedan e col. (1998), utilizando os *primers* frax-m4 (5'-CTT GAG GCC CAG CCG CCG TCG GCC-3') e frax-m5 (5'-CGG GGG GCG TGC GGT AAC GGC CCA A-3'), descritos por Entezam e col. (2007). Os sítios de ligação desses *primers* situam-se imediatamente adjacentes à repetição CGG e suas extremidades 3' são exclusivas do alelo KI. Assim, somente os alelos KI são amplificados por PCR, revelando quais animais são portadores de pré-mutação. (Figura III.1). A reação de PCR teve volume final de 25 μl, contendo 1 μg de DNA, 50 pmol de cada um dos *primers*, 200 mM dos dNTP, 2% de dimetilsulfóxido (DMSO), betaína 2,5 M, $MgCl_2$ 1,5 mM e 1 μl da polimerase do kit Expand High Fidelity PCR System (Roche), no tampão da enzima 1 x. As condições de ciclagem foram 95° C por 10 min, seguindo-se 35 ciclos de 95° C, 1 min, 65° C, 1 min e 75° C, 5 min e uma etapa final a 72° C por10 min.

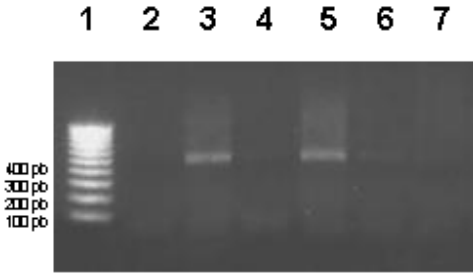

Figura III.1: Detecção do alelo KI por PCR: Eletroforese, em gel de agarose 2%, dos produtos de PCR obtidos a partir de DNA de camundongos, usando *primers* cujas regiões 3' são exclusivas para o alelo KI. Pista 1: 100 bp DNA *ladder*; 2: controle negativo (fêmea normal); 3: controle positivo (fêmea portadora do alelo KI); 4: macho selvagem; 6 e 7: fêmeas selvagens; 5: fêmea portadora do alelo KI. Eletroforese: 25 min, 80 V.

III.3.3. Obtenção de linhagem de células tronco embrionárias (ESC)

Fêmeas de camundongo WT e KI foram submetidas ao protocolo de hiperestimulação ovariana, acasalamento e coleta de embriões. As fêmeas WT foram cruzadas com machos portadores do alelo KI; desses cruzamentos resultam fêmeas portadoras e machos não portadores. As fêmeas KI foram cruzadas com camundongos WT; logo, desses cruzamentos devem resultar embriões dos dois sexos, portadores ou não, na proporção de 50%.

Coleta de ovócitos fertilizados

Fêmeas com 14 a 20 dias de vida receberam injeção intraperitoneal de PMSG (gonadotropina sérica de égua grávida, 5 U, Calbiochem) e, após 48 h, injeção de hCG (gonadotropina coriônica humana, 5 IU, Calbiochem). As fêmeas foram colocadas em gaiolas junto aos machos para acasalamento e, no dia seguinte, verificamos a presença do tampão mucoso. Em caso positivo, 18 a 20 horas após a última injeção, as fêmeas foram sacrificadas por deslocamento cervical, para obtenção dos ovidutos, que foram colocados em meio KSOM tamponado com Hepes (preparado no laboratório, de acordo com Nagy e col. 2003) e dissecados sob estereomicroscópio para separação dos ovócitos fertilizados.

Os embriões foram mantidos em estufa a 37ºC e 5% de CO_2, em placas de Petri estéreis, contendo microgotas de meio KSOM, cobertas com óleo mineral. O desenvolvimento embrionário foi observado e documentado utilizando microscópio invertido, durante três dias, até que o estágio de blastocisto fosse atingido.

Obtenção de fibroblastos embrionários de camundongos (MEF)

As ESC foram cultivadas sobre uma camada de células *feeder*, composta por MEF. Para obtenção de cultura primária dessas células, fêmeas grávidas (E12-E14) foram sacrificadas por deslocamento cervical, mergulhadas em etanol 70% para esterilização e dissecadas em fluxo laminar para retirada do útero e separação dos embriões, em PBS. Cada embrião teve os membros, as vísceras e a cabeça retirados; o tecido restante foi lavado em PBS e transferido para uma placa de Petri, onde foi cortado com auxílio de tesoura de ponta fina até formar uma massa homogênea. Foi então adicionada solução de Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) e a suspensão foi incubada em banho-maria a 37º C por 5 minutos e, após pipetação para dissociação do tecido, novamente incubada por mais 5 min. A digestão foi interrompida pela adição de SFB e, após centrifugação por 6 min a 1100 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, ressuspendido em meio de cultura DMEM (Gibco), contendo 10% de SFB, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram semeadas em placas de 15 cm de diâmetro revestidas com gelatina e, após atingirem confluência, aliquotadas em criotubos e congeladas em nitrogênio líquido, no mesmo meio de cultura, porém contendo 50% de SFB e 10% de DMSO.

Dois a três dias antes do uso como células *feeder*, as alíquotas de MEF foram descongeladas e centrifugadas, o sobrenadante, descartado e as células ressuspendidas em meio de cultura foram semeadas em placas ou poços de cultura. Ao atingirem a confluência, o crescimento foi interrompido pela adição de 10 µg de mitomicina C para cada mL de meio de cultura, por 2h30min a 37ºC. As células foram lavadas duas vezes com PBS e o meio, substituído por meio de cultivo de ESC.

Obtenção de botões embrionários

Os blastocistos foram transferidos para placas de cultura de quatro poços, contendo a camada *feeder* de MEF. A transferência foi feita sob estereomicroscópio, com o auxílio de pipeta Pasteur. O meio de cultivo (meio kES) era composto de Knockout-DMEM (Gibco), 20% *knockout serum replacement* (KSR, Sigma), 1% penicilina/streptomicina, 1% L-glutamina, 0,001% β-mercaptoetanol (Sigma), 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA; Sigma) e 1x fator inibidor de leucemia (LIF; Chemicon).

Os blastocistos foram mantidos a 37ºC e 5% de CO_2 por dois dias para eclodirem da zona pelúcida e aderirem à camada de células *feeder*. A partir daí, o trofoblasto fica aderido à placa e o embrioblasto forma um agregado de células, denominado botão embrionário. A cultura foi mantida durante sete dias para crescimento do botão embrionário e o meio de cultura, trocado diariamente. Os botões embrionários foram então descolados da placa em que cresceram e transferidos para placas de Petri, contendo microgotas de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), onde foram dissociados com o auxílio de agulhas de 30 *gauge* e também por pipetação. A suspensão foi transferida para uma gota de inibidor de tripsina (Sigma) para interromper a digestão e finalmente, semeada em placa de quatro poços, contendo uma camada de células *feeder* e meio de cultura kES, e o meio de cultivo teve 50% de seu volume trocado diariamente. Espera-se que, a partir desse ponto, as células em cultura adquiram o aspecto globular característico das ESC.

III.3.4. Detecção da distribuição subcelular da FMRP por imunocoloração

Para imunocoloração em blastocistos e ESC, seguimos o protocolo utilizado no Laboratory of Reproductive Medicine, USF (Huang e col. 2008). O material, embriões ou células, foi fixado em paraformaldeído 3,7% por 15 min a 4° C, lavado duas vezes por 15 min com PBS a 4° C, permeabilizado com Triton-X-100 0,1% em solução de bloqueio (soro de cabra 3%, BSA 0,1% em PBS), por 30 min à temperatura ambiente (TA) e lavado três vezes em solução de bloqueio (SB) por 15 min. Seguiu-se bloqueio em SB por uma hora à TA e incubação com o anticorpo primário anti-FMRP monoclonal obtido em camundongo (1C3, Chemicon) 1:400, *overnight* a 4° C; após três lavagens por 15 min em SB à TA, procedeu-se à incubação com anticorpo secundário anti-camundongo obtido em cabra associado a Cy3 1:100 em SB, por 1 hora à TA; após três lavagens em SB por 15 min à TA, foi feita a montagem em lâmina com Vectashield-DAPI. Para imunocoloração de embriões, foi adicionada polivinil pirrolidona (PVP), na concentração final de 0,1% à solução de bloqueio.

III.4. Resultados

III.4.1. Obtenção de linhagem de células tronco embrionárias KI quanto ao Fmr1

Tentamos o estabelecimento de linhagem de ESC portadora da pré-mutação a partir dos embriões de fêmeas selvagens cruzadas com machos KI e de fêmeas KI cruzadas com machos selvagens. O desenvolvimento de embriões, dos dois tipos de fêmeas foi acompanhado diariamente até atingirem o estágio de blastocisto. No total, 21 blastocistos de seis fêmeas KI e 37, de sete fêmeas selvagens, foram transferidos para as placas de quatro poços com uma camada de células *feeder* (Figura III.3A). As placas permaneceram por dois dias em estufa para adesão dos blastocistos à camada de células *feeder* e 11 deles aderiram. O trofoblasto foi visualizado aderido à placa e o embrioblasto, formando o agregado de células denominado botão embrionário (Figura III.2B).

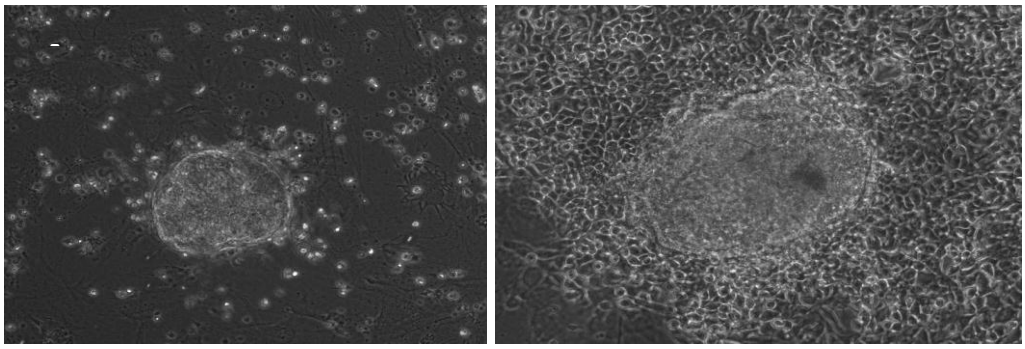

Figura III.2: Botão embrionário (A) após dois dias em cultura e (B) após sete dias em cultura. Em (B), observa-se que o botão embrionário é maior e o trofoblasto cresceu aderido às células *feeder*.

Para obtenção das ESC, realizamos a dissociação dos botões embrionários, como detalhado no item III.3.4. As células foram semeadas sobre a camada de células *feeder* e mantidas em estufa a 37ºC por dois dias; após esse período, esperava-se visualizar botões embrionários semelhantes ao mostrado na Figua III.2 A; entretanto, essas estruturas não foram visualizadas. Assim, apesar de contarmos com a assistência constante de profissionais experientes na obtenção de linhagens de células tronco embrionárias, a pesquisadora Dra. Maja Okuka e o então doutorando Junjiu Huang, da equipe do Dr. David L Keefe, não tivemos sucesso na obtenção de linhagens ESC de camundongos KI. O insucesso pode ser atribuído a dificuldades inerentes à própria técnica de derivação de células tronco embrionárias.

III.4.2. Análise do desenvolvimento de embriões de fêmeas KI e WT

Aspectos morfológicos

Durante o cultivo de embriões para obtenção de ESC, notamos que os embriões de fêmeas portadoras da pré-mutação (KI) apresentavam mais freqüentemente blastômeros assimétricos (com tamanho e forma irregulares) fragmentação e parada de desenvolvimento, quando comparados aos embriões de fêmeas selvagens (WT) (Figura III.3).

No dia 2 de cultivo (D2), o tamanho dos blastômeros dos embriões das fêmeas KI foi mais variável e havia mais fragmentação, em comparação com os embriões das fêmeas WT. No

dia 3 (D3), a maioria dos embriões das fêmeas WT atingiu o estágio de mórula, o que ocorreu com número relativamente menor de embriões das fêmeas KI. No dia 4 (D4), havia maior número de embriões com o desenvolvimento estacionado, sem atingir o estágio de blastocisto, entre as amostras provenientes das fêmeas KI (Figura III.3).

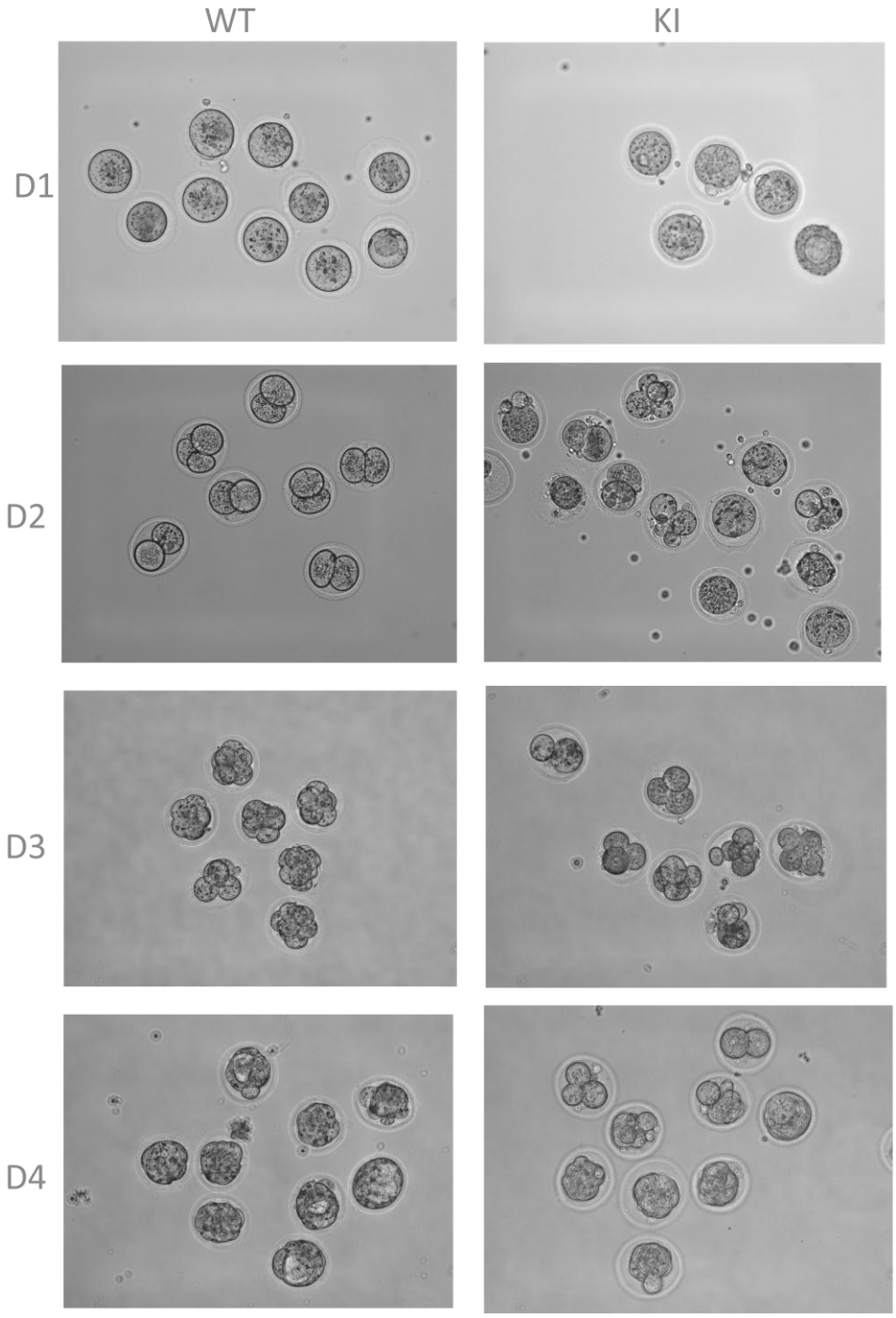

Figura III.3: Embriões de fêmeas de camundongo selvagens (WT) e pré mutadas (KI) no início do desenvolvimento in vitro. No D1, ovócitos fertilizados de fêmeas WT e KI têm aspecto semelhante. No D2, a clivagem dos embriões das fêmeas WT é uniforme, formando embriões com dois blastômeros simétricos, enquanto os das fêmeas KI apresentam uma, duas ou mais células e fragmentação. No D3, a maioria dos embriões das fêmeas WT está no estágio de mórula, o que não ocorre com grande parte dos embriões das fêmeas KI. No D4, os embriões de fêmeas KI, com parada de desenvolvimento e que não atingiram o estágio de blastocisto, são em número maior do que entre os embriões das fêmeas WT.

Análise quantitativa

Na Tabela III.1, relacionamos dados referentes aos cruzamentos de fêmeas WT com machos KI e de fêmeas KI com machos WT: número total de ovócitos fertilizados coletados (D1), de embriões com 8 a 16 células no D3, e de blastocistos, no D4 de cultivo.

Tabela III.1: Número total de ovócitos fecundados coletados (D1), de embriões com 8 a 16 células (D3) e de blastocistos (D4), provenientes de fêmeas portadoras de pré-mutação (KI) e de fêmeas selvagens (WT).

Fêmea	Ovócitos fertilizados	Embriões com 8 a 16 células (D3)	Blastocistos (D4)
KI 1	23	11	7
KI 2	32	21	0
KI 3	19	12	9
KI 4	41	24	4
KI 5	23	13	1
KI 6	18	7	0
Total	**156**	**88**	**21**
WT 1	27	17	15
WT 2	25	22	0
WT 3	38	28	1
WT 4	12	9	5
WT 5	17	9	7
WT 6	16	7	4
WT 7	16	10	5
Total	**151**	**102**	**37**

O número médio de ovócitos fertilizados coletados foi maior no grupo de fêmeas KI do que no grupo de fêmeas selvagens (KI = 26 ± 8,85 e WT = 21,57 ± 9), mas a diferença não foi estatisticamente significativa [p = 0,29; Mann-Whitney, utilizando o aplicativo GraphPad InStat (GraphPad Software V2.00, 1990-3)]. As médias dos números de embriões com 8 a 16 células no D3, nos dois grupos de fêmeas, não diferiram (KI = 14,66 ± 6,47 e WT = 14,57 ± 7,98; p = 0,73). Entre esses embriões, entretanto, foram computados também aqueles que apresentavam fragmentação ou tamanho irregular de blastômeros, que estavam mais representados no grupo das fêmeas KI. Quanto aos blastocistos formados no D4, o número médio foi menor no grupo de fêmeas KI (KI = 3,5 ± 3,83 e WT=5,28 ± 4,92), mas a diferença não foi estatisticamente significativa (p = 0,53).

Para os dois grupos de fêmeas estimamos as taxas de sobrevivência de ovócitos para blastocistos [KI = 21/ 156 = 0.135 (0.085-0.198)]; WT = 37/ 151 = 0.245 (0.179-0.322)] e de embriões com 8 a 16 células para blastocistos [KI = 21/88 = 0.239 (0.154-0.341); WT = 37/ 102 = 0.363 (0.270-0.464)], que foram sempre menores para o grupo de fêmeas KI. Entretanto, nos dois casos, as diferenças entre as taxas médias de sobrevivência não foram estatisticamente significativas: taxa média de sobrevivência de ovócitos para blastocistos, KI = 0.15 ± 0.19, WT= 0.28 ± 0.21; p = 0.36; taxa média de sobrevivência de embriões D3 para blastocistos, KI = 0.27 ± 0.33, WT = 0.48 ± 0.34,
p = 0,44). Apesar dos valores de probabilidade correspondentes aos testes, esses resultados devem ser olhados com cautela, diante da grande variabilidade entre as fêmeas quanto ao número de blastocistos formados e o pequeno número delas, seis no grupo KI e sete no grupo WT.

III.4.3. Localização subcelular da Fmrp

Em blastocistos de fêmeas KI e WT

Foram estudados blastocistos (D 4), obtidos de quatro fêmeas, sendo duas da linhagem C57 WT, cruzadas com machos KI e duas da linhagem KI, cruzadas com machos WT; assim, havia blastocistos com genótipo KI e WT, em ambas as amostras.

A imunocoloração revelou marcação granulosa da Fmrp, dispersa por todo o blastocisto, em ambos os casos. (Figura III.4).

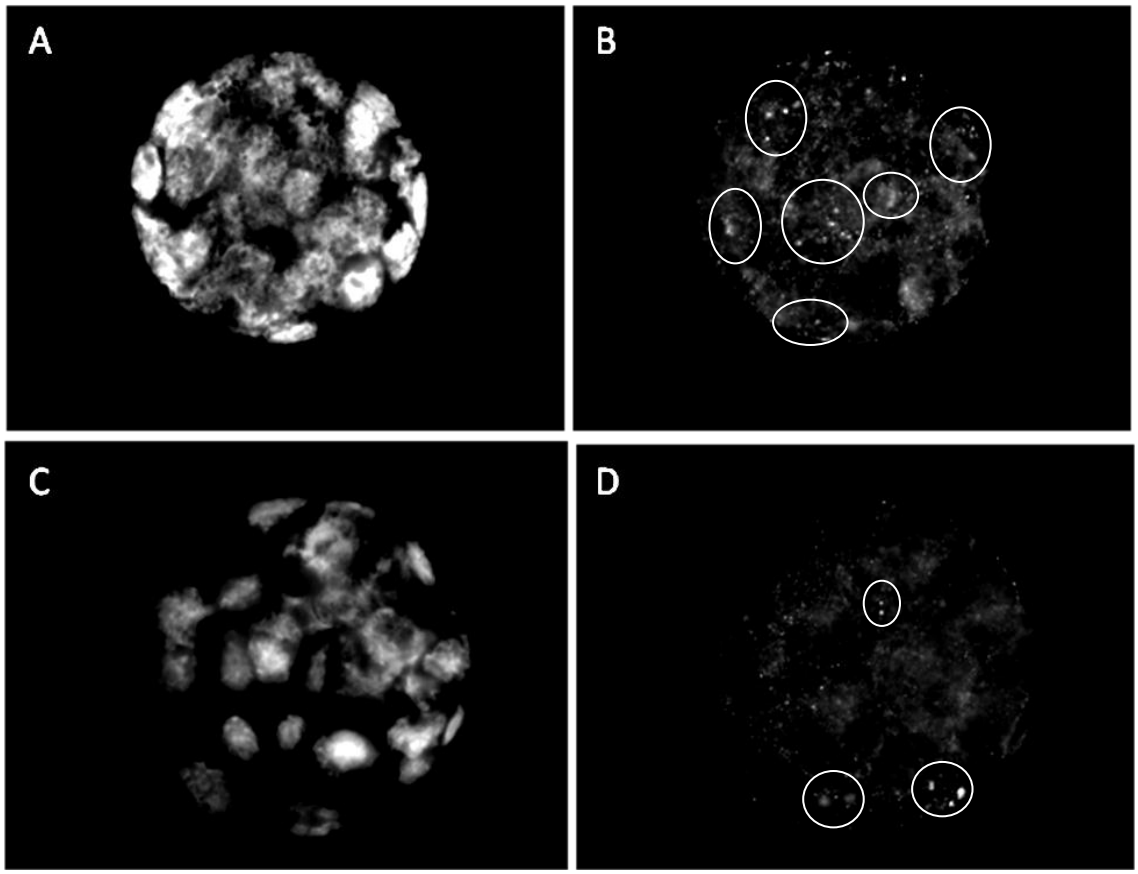

Figura III.4: Imunofluorescência indireta mostrando a distribuição da Fmrp em blastocistos de fêmeas WT cruzadas com machos KI (A e B) e de fêmeas KI cruzadas com machos WT (C e D). (A) e (C), coloração da cromatina com DAPI; (B) e (D), tratamento com anticorpo primário anti-Fmrp e anticorpo secundário conjugado a FITC. A marcação revela distribuição granular e dispersa da Fmrp. Por comparação (A vs. B e C vs. D), a proteína parece estar presente apenas no citoplasma, não corado pelo DAPI. As granulações, que parecem ser mais numerosas em embriões de fêmeas selvagens, são frequentemente mais grosseiras nos blastocistos de fêmeas KI. Microfotografia: tempo de exposição, 52 ms.

Uma vez que as imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência não confocal, não foi possível determinar se a localização da Fmrp é exclusivamente citoplasmática ou se pode estar também no núcleo das células do embrião. Entretanto, por comparação das imagens capturadas após coloração DAPI (cromatina) e imunocoloração (Figura III.4, A vs. B e C vs. D), a distribuição da Fmrp aparenta ser basicamente citoplasmática. As granulações

pareceram ser mais frequentes nos blastocistos de fêmeas selvagens, mas mais grosseiras naqueles de fêmeas KI (Figura III.4, B e D).

Em células tronco embrionárias WT

Uma vez que tínhamos como objetivo derivar ESC da linhagem de camundongos KI, para comparar a expressão do gene *Fmr1* entre essas células e ESC derivadas de camundongos WT da linhagem C57, verificamos a presença da gene *Fmrp* nas ESC desses animais. As ESC de camundongos WT da linhagem C57, tratadas com anticorpo primário anti-FMRP (1C3) e anticorpo secundário ligado a FITC, mostraram coloração granular dispersa no citoplasma (Figura III.5). Essa distribuição citoplasmática da Fmrp, dispersa e com algumas granulações mais grosseiras, assemelha-se à que observamos nas HGC e nas MGC, conforme resultados descritos e discutidos no Capítulo II deste trabalho.

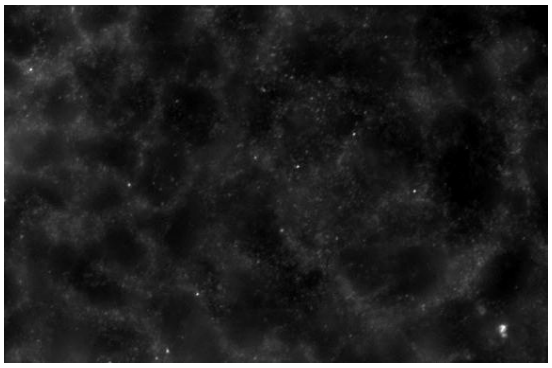

Figura III.5: Distribuição da Fmrp em células tronco embrionárias de camundongos selvagens da linhagem C57, avaliada por imunofluorescência indireta. As células foram tratadas com anticorpo anti-Fmrp de camundongo e anticorpo secundário conjugado a FITC. A marcação é leve e revela a distribuição da Fmrp dispersa no citoplasma e em granulações, evidenciadas pelos sinais mais intensos.

III.5. Discussão

Nosso objetivo de derivar linhagem células tronco embrionárias KI quanto ao gene *FMR1* não foi cumprido, apesar de termos realizado os experimentos num laboratório com larga experiência na obtenção de ESC. O insucesso pode ser atribuído às dificuldades inerentes à obtenção de células tronco embrionárias.

No acompanhamento do desenvolvimento *in vitro* de embriões obtidos de fêmeas selvagens cruzadas com machos KI e de fêmeas KI cruzadas com machos selvagens, alterações de clivagem e parada de desenvolvimento foram mais frequentemente observadas nos embriões obtidos de fêmeas KI. A avaliação morfológica é utilizada em ciclos de fertilização assistida como preditiva da qualidade dos embriões; as características morfológicas consideradas ideais nesse sistema de avaliação são simetria de forma e tamanho dos blastômeros e ausência de fragmentação (Giorgetti e col. 1995). A morfologia dos blastômeros no dia 2 se reflete na qualidade embrionária no dia 3 de cultivo (Ciray e col. 2008) e a transferência de embriões que apresentam células regulares no dia 2 de cultivo resulta em maior taxa de implantação e de gravidez em ciclos de fertilização assistida (Ciray e col. 2008, Hesters e col. 2008).

Os embriões das fêmeas selvagens e KI que analisamos tinham igual chance de serem KI ou selvagens, portanto as diferenças que observamos não devem estar relacionadas com o genótipo do embrião, mas com condições maternas.

Não há na literatura relatos da função do gene *Fmr1*nos estágios mais precoces do desenvolvimento em mamíferos. Os estudos funcionais do *Fmr1* no desenvolvimento de mamíferos são focados principalmente no desenvolvimento neural, a partir da formação e proliferação de células precursoras (revisão em Till 2010). Em drosófila, foi descrito que a dFmrp é necessária para a celularização (Monzo e col. 2006), evento da transição meso-blástula (*mid-blastula transition*, MBT), quando ocorre a degradação de transcritos maternos e a ativação do genoma do embrião. A dFmrp, juntamente com a caprina (que, em humanos, atua como um regulador de tradução transcrito-específico, necessário para a plasticidade sináptica, assim como a FMRP), assegura a correta ativação temporal da MBT, mediando diretamente a repressão normal do mRNA materno da cliclina B e a ativação do mRNA embrionário do gene *frühstart* (Papoulas e col. 2010). Em embriões de drosófila nulos quanto ao *dFmr1*, ocorre redução na atividade normal de inibição da transcrição de uma série de genes no início do desenvolvimento e esse efeito é mais acentuado quando a mãe também tem genótipo nulo (Deshpande e col. 2006). O silenciamento gênico seria, portanto, dependente do *dFmr1* de contribuição materna, de acordo com a idéia de que o *dFmr1* participa do estabelecimento do silenciamento gênico na embriogênese.

Diante da conservação do gene, pode-se supor função semelhante em mamíferos. A pré-mutação do *FMR1* em células somáticas humanas está relacionada à produção de maior quantidade do transcrito, o que seria uma resposta à menor eficiência na síntese da FMRP decorrente da repetição CGG expandida no mRNA (Tassone e col. 2000; Kenneson e col. 2001); além disso, a presença do transcrito com a expansão CGG no núcleo aparece como suficiente para induzir redução da viabilidade de células neuronais em cultura (Arocena e col. 2005). Assim, uma pré-mutação materna, por esses efeitos, pode alterar o início do desenvolvimento embrionário, independentemente do genótipo dos embriões. Nos ovários de fêmeas de camundongo, os ovócitos de folículos imaturos não apresentam quantidades expressivas da Fmrp (Hergersberg e col. 1995), porém nos folículos em crescimento foi observado aumento na expressão da proteína no citoplasma do ovócito (Bakker e col. 2000). Portanto, o gene *Fmr1* pode ser um gene de efeito materno em mamífero. Os genes de efeito materno são transcritos durante a ovulogênese e fenótipos embrionários alterados refletem o genótipo da mãe (revisão em Li e col. 2010). O padrão de distribuição da Fmrp que observamos em blastocistos foi sugestivo de granulações em menor número e freqüentemente mais grosseiras nos blastocistos de fêmeas KI, em comparação com embriões de fêmeas selvagens, o que seria independente do genótipo desses blastocistos. Haveria, assim, um efeito do genótipo materno no padrão apresentado pela Fmrp no blastocisto.

O conjunto de nossos dados sugere a influência da pré-mutação do gene *Fmr1* em fêmea murina sobre o início do desenvolvimento de seus embriões. Esse aspecto necessita investigação mais aprofundada.

CAPÍTULO IV

Sumário e Conclusões

Este estudo teve como objetivo geral a análise do gene *FMR1* (***F****ragile X* ***M****ental* ***R****etardation gene* ***1***) quanto a sua relação com a insuficiência ovariana primária (***F****ragile* ***X****-related* ***P****rimary* ***O****varian* ***I****nsufficiency*, FXPOI).

No Capítulo I, apresentamos revisão da literatura sobre FXPOI. A pré-mutação do gene *FMR1* constitui a mais frequente causa genética de predisposição para menopausa precoce e entre os casos familiais, cerca de 10% estão associados à pré-mutação do gene *FMR1*. Entretanto, pouco se conhece sobre a expressão do gene no ovário de mamíferos e os mecanismos pelos quais a pré-mutação causa POI permanecem desconhecidos.

O Capítulo II apresenta os resultados do estudo da expressão do gene *FMR1* nos ovários adultos, humano e murino. As enormes dificuldades inerentes à obtenção e ao estudo de células germinativas femininas nos levaram a estudar células da granulosa humana (HGC), que são de fácil obtenção, como subprodutos de procedimentos de fertilização *in vitro*. Também estudamos a expressão do *Fmr1* em células da granulosa de camundongos da linhagem CD1 (MGC), coletadas nos ovidutos, após estimulação da ovulação. As células da granulosa interagem intensamente com os ovócitos durante a foliculogênese, transmitindo sinais através do ovário e apoiando o crescimento e a maturação dos ovócitos durante as últimas fases do crescimento folicular. É, portanto, possível que alterações celulares induzidas pela pré-mutação do gene *FMR1* nas HGC afetem o crescimento folicular, a taxa de ovulação e a fecundidade.

Padronizamos os protocolos de isolamento e de cultivo das HGC do fluido folicular e confirmamos a origem das células isoladas pela expressão de marcadores de HGC, por RT-PCR, e pela natureza lipídica dos grânulos citoplasmáticos, pela coloração com o corante lipofílico DiI.

Demonstramos, por RT-PCR que as HGC isoladas do líquido folicular expressam o mRNA do *FMR1*. Em camundongos, também por RT-PCR, evidenciamos a expressão do mRNA do *Fmr1* em ovócitos e nas MGC, coletados do oviduto após hiper-estimulação da ovulação.

Por hibridação *in situ* de RNA em HCG cultivadas, detectamos o mRNA do *FMR1* disperso no citoplasma e no núcleo, concentrado em regiões cujas características indicaram ser nucléolos. Essa mesma distribuição foi observada em fibroblastos cultivados. Essa provável localização nucleolar sugere que o transcrito do *FMR1*, nessas células, constitua ribonucleoproteínas mensageiras, para seu direcionamento do nucléolo para sítios citoplasmáticos específicos, onde ocorre sua tradução.

Verificamos, por Western *blotting*, que as HGC expressam, em níveis elevados, isoformas da FMRP, com massa molecular entre 60 e 95 kDa.

Determinamos a localização subcelular da FMRP nas HGC e da Fmrp nas MGC, por imunocoloração. Os sinais de hibridação foram visualizados dispersos, em grânulos finos, no citoplasma das HGC e das MGC, de maneira semelhante ao padrão de distribuição da proteína em neurônios. Nos filopódios das MGC, observamos marcação concentrada em alguns pontos, de forma semelhante ao padrão, previamente descrito, de distribuição da Fmrp em espinhas dendríticas de neurônios de hipocampo de rato, constituindo grânulos de RNA, que promovem o transporte de mRNA e controlam a tradução. O padrão de distribuição semelhante entre neurônios e MGC pode refletir similaridade da função da Fmrp nos dois tecidos.

A indução de estresse oxidativo nas HGC por tratamento com arsenito sódico, levou a proteína a deixar de ter distribuição citoplasmática difusa e passar a fazer parte de grânulos de estresse perinucleares, colocalizando-se com TIA-1, marcador dessas estruturas. Resultados semelhantes foram anteriormente obtidos em células HeLa e no hipocampo de rato. Esses resultados apoiam a hipótese de que a FMRP participa do mecanismo transitório de parada da tradução após estresse.

No Capítulo III, descrevemos nossas tentativas para obtenção de linhagem de células tronco embrionárias (ESC) de camundongo *knockin* (KI) quanto a pré-mutação do gene *Fmr1*. Para a obtenção de embriões KI, fêmeas selvagens (WT; linhagem C57) foram cruzadas com machos KI (linhagem C57/BL6) e fêmeas KI foram cruzadas com machos WT. Pretendíamos comparar a expressão do gene *Fmr1* na linhagem de ESC KI e linhagem de ESC WT, inclusive durante a diferenciação Não tivemos sucesso, o que pode ser atribuído às dificuldades inerentes à obtenção de ESC.

No acompanhamento dos primeiros quatro dias do desenvolvimento *in vitro* dos embriões, alterações de clivagem e parada de desenvolvimento foram mais frequentemente

observadas nos embriões obtidos de fêmeas KI. Entretanto as taxas médias de sobrevivência de ovócitos para blastocistos e de embriões com 8 a 16 células para blastocistos não diferiram estatisticamente entre as fêmeas KI e selvagens; a grande variabilidade entre o número de blastocistos obtidos por fêmea e o pequeno número delas nos grupos KI (seis) e selvagem (sete) indicam que esses resultados devem ser interpretados com cautela. A análise da proteína Fmrp nos blastocistos, por imunocoloração, mostrou distribuição provavelmente citoplasmática, com padrão granular de marcação, sendo as granulações mais frequentes nos blastocistos de fêmeas WT, porém mais grosseiras nos blastocistos de fêmeas KI. Esse conjunto de dados é sugestivo de efeito da pré-mutação do gene *Fmr1* em fêmea murina sobre o início do desenvolvimento de seus embriões. Esse aspecto necessita investigação mais aprofundada.

Abstract

This study aimed at investigating the *FMR1* gene (Fragile X Mental Retardation gene 1), regarding its relationship with primary ovarian insufficiency (**F**ragile **X**-related **P**rimary **O**varian **I**nsufficiency, FXPOI).

In Chapter I, we present a literature review on FXPOI. The *FMR1* premutation is the most frequent genetic cause of predisposition to premature ovary insufficiency (POI) and, among the POI familial cases, about 10% are associated with the *FMR1* gene premutation. However, little is known about the gene expression in the mammal ovary, and the mechanisms by which the premutation causes POI remain unknown.

Chapter II presents the study of the *FMR1* gene expression in the human and murine adult ovaries. The enormous difficulties inherent in obtaining and studying female germ cells led us to study human granulosa cells (HGC), which are easily obtained as byproducts of *in vitro* fertilization procedures. We also studied the *FMR1*expression in granulosa cells of mice of the CD1 strain (MGC), collected from the oviducts after ovulation induction. Granulosa cells interact functionally with oocytes during folliculogenesis, transmitting signals through the ovary and supporting growth and maturation of oocytes during the later stages of follicular growth. It is, therefore, possible that cellular changes induced by the *FMR1* premutation in HGCs affect follicular growth, ovulation rate and fecundity.

We standardized protocols for isolation and culture of HGCs obtained from follicular fluid and confirmed the origin of the isolated cells by the expression of HGC markers, using RT-PCR, and by the lipid nature of the cytoplasmic granules, as demonstrated by the staining with the lipophilic dye DiI.

We demonstrated, by RT-PCR, that HGCs isolated from follicular fluid express the *FMR1* mRNA. In mice, also by RT-PCR, we detected the *Fmr1* mRNA in oocytes and in the MGCs, collected from the oviduct after ovulation hyperstimulation.

Using RNA *in situ* hybridization on cultured HCGs, we detected the *FMR1* mRNA dispersed in the cytoplasm and, in the nucleus, concentrated in regions whose features indicated to be nucleoli. This same distribution was observed in cultured fibroblasts. This probable

nucleolar localization of the *FMR1* transcript in these cells suggests that it constitutes messenger ribonucleoproteins for further targeting to specific cytoplasmic sites where translation occurs.

We verified, by Western blotting, that HGCs express high levels of the main FMRP isoforms, with molecular mass between 60 and 95 kDa.

We determined the FMRP subcellular localization in HGCs and that of Fmrp in MGCs, by immunostaining. The hybridization signals were seen scattered in fine granules in the cytoplasm of both HGCs and MGCs, in a pattern of distribution similar to that observed in neurons. In the MGC filopodia, the protein labeling was concentrated at some sites, similar to the previously described pattern of Fmrp distribution in neuronal dendritic spines of rat hippocampus, where it is part of RNA granules, promoting mRNA transport and translation control. The similar distribution pattern between neurons and MGC may reflect the similarity of FMRP function in both tissues.

The induction of oxidative stress in the HGC by treatment with sodium arsenite led the protein to leave its diffuse cytoplasmic distribution to become part of perinuclear stress granules, co-localized with TIA-1, a marker of these structures. Similar results were previously obtained in HeLa cells and in rat hippocampus. These results support the hypothesis that FMRP participates in the mechanism of the transient translation arrest after stress.

In Chapter III, we describe our attempts to obtain an embryonic stem cell line (ESC) from *knock-in* mice (KI) for the *FMR1* premutation. To obtain KI embryos, wild females (WT, strain C57) were crossed with males KI (strain C57/BL6), and KI females were crossed with WT males. We planned to compare the expression of the *fmr1* gene in the ESCs from the KI and WT strains, including during differentiation. We did not succeed in obtaining an ESC KI line, which can be attributed to difficulties inherent to the procedure.

At follow-up of the first four days of *in vitro* development of embryos, changes in cleavage and developmental arrest were more frequently observed in embryos obtained from KI females. Meanwhile, the average survival rates of oocytes to blastocysts, and 8-16 cell embryos to blastocysts were not statistically different between the KI and WT females. The great variability among the numbers of blastocysts obtained per female and the small size of the KI (six females) and WT (seven females) groups indicate that these results should be interpreted

with caution. Immunostaining analysis of the Fmrp in blastocysts showed a probably cytoplasmic distribution, with a granular pattern of labeling, the grains being more common in blastocysts from WT females, but coarser in blastocysts from KI females. These data are suggestive that the *Fmr1* premutation in murine females affects the early development of their embryos. This aspect needs further investigation.

Referências Bibliográficas

Abrams L (2007). From POF to POI: evolution of a term. The National Fragile X Foundation Quarterly **29:**22.

ACOG Committee Opinion No. 338 (2006): Screening for Fragile X Syndrome. *Obstet Gynecol.***107**:1483–5.

Adhikari AS, Sridhar Rao K, Rangaraj N, Parnaik VK, Mohan Rao Ch (2004). Heat stress-induced localization of small heat shock proteins in mouse myoblasts: intranuclear lamin A/C speckles as target for alphaB-crystallin and Hsp25. *Exp Cell Res.* **299**(2):393-403.

Aittomaki K (1994). The genetics of XX gonadal dysgenesis. *Am. J. Hum. Genet.* **54**: 844-51.

Aittomaki K, Lucena, JLD, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, Kaskikari R, Sankila EM, Lehvaslaiho H, Engel AR, Nieschlag E, Huhtaniemi I, de la Chapelle A (1995). Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* **82**: 959-968.

Allen EG, He W, Yadav-Shah M, Sherman SL (2004). A study of the distributional characteristics of FMR1 transcript levels in 238 individuals. *Hum Genet*. **114:** 439–47.

Allen EG, Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, Epstein MP, Charen K, He W, Taylor KC, Sherman SL (2007). Examination of reproductive aging milestones among women who carry the FMR1 premutation. *Hum Reprod*. **22**(8):2142-52.

Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D *et al.* (1999). Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the international collaborative POF in fragile X study--preliminary data. *Am. J. Med. Genet.* **83**: 322-325.

Arocena DG, Iwahashi CK, Won N, Beilina A, Ludwig AL, Tassone F, Schwartz PH, Hagerman PJ (2005). Induction of inclusion formation and disruption of lamin A/C structure by premutation CGG-repeat RNA in human cultured neural cells. *Hum Mol Genet.* **14**(23):3661-71.

Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL, Warren ST (1993). Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet.* **4**(3):244-51.

Bachner D, Manca A, Steinbach P, Wohrle D, Just W, Vogel W, Hameister H, Poustka A (1993). Enhanced expression of the murine FMR1 gene during germ cell proliferation suggests a special function in both the male and the female gonad. *Hum Mol Genet.* **2**(12):2043-50.

Bakker CE, de Diego Otero Y, Bontekoe C, Raghoe P, Luteijn T, Hoogeveen AT, Oostra BA, Willemsen R (2000). Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. *Exp Cell Res.* **258**(1):162-70.

Bardoni B, Davidovic L, Bensaid M, Khandjian EW (2006). The fragile X syndrome: exploring its molecular basis and seeking a treatment. *Expert Rev Mol Med*. **8**(8):1-16.

Bechara EG, Didiot MC, Melko M, Davidovic L, Bensaid M, Martin P, Castets M, Pognonec P, Khandjian EW, Moine H, Bardoni B (2009). A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biol*. 7:e16.

Beilina A, Tassone F, Schwartz PH, Sahota P, Hagerman PJ (2004). Redistribution of transcription start sites within the FMR1 promoter region with expansion of the downstream CGG-repeat element. *Hum Mol Genet.* **13**(5):543-9.

Bennett CE, Conway GS, Macpherson JN, Jacobs PA, Murray A (2010). Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure. *Hum Reprod.* **25**(5):1335-8.

Berry-Kravis E, Potanos K, Weinberg D, Zhou L, Goetz CG (2005). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in sisters related to X-inactivation. *Ann Neurol.* **57** (1):144-7.

Bibi G, Malcov M, Yuval Y, Reches A, Ben-Yosef D, Almog B, Amit A, Azem F (2010). The effect of CGG repeat number on ovarian response among fragile X premutation carriers undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril.* 94(3):869-74.

Bina S and Zeidler M (2009). JAK/STAT Pathway Signalling in Drosophila Melanogaster *In* Stephanou A [ed]. JAK-STAT Pathway in Disease, 1st edition. Landes Bioscience.

Black SH, Levinson G, Harton GL, Palmer FT, Sisson ME, Schoerer C, Nance E, Fugger EF, Fields RA (1995). Preimplantation genetic testing (PGT) for Fragile X (fraX). *Am J Med Genet.* **57**:4 (Abstract 153).

Bodega B, Bione S, Dalpra L, Toniolo D, Ornaghi F, Vegetti W, Ginelli E, Marozzi A (2006). Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation. *Hum Reprod.* **21**(4):952-7.

Bontekoe CJ, Bakker CE, Nieuwenhuizen IM, van der Linde H, Lans H, de Lange D, Hirst MC, Oostra BA (2001). Instability of a $(CGG)_{98}$ repeat in the Fmr1 promoter. *Hum Mol Genet.* **10**(16):1693-9.

Bretherick KL, Fluker MR, Robinson WP (2005). FMR1 repeat sizes in the gray zone and high end of the normal range are associated with premature ovarian failure. *Hum Genet.* **117**(4):376-82.

Broers JL, Kuijpers HJ, Ostlund C, Worman HJ, Endert J, Ramaekers FC (2005). Both lamin A and lamin C mutations cause lamina instability as well as loss of internal nuclear lamin organization. *Exp Cell Res.* **304**(2):582-92.

Brouwer JR, Huizer K, Severijnen LA, Hukema RK, Berman RF, Oostra BA, Willemsen R. (2008) CGG-repeat length and neuropathological and molecular correlates in a mouse model for fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *J Neurochem.* **107:** 1671-82.

Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB, Warren ST (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*. **107**(4):477-87.

Castrén M, Haapasalo A, Oostra BA, Castrén E (2001). Subcellular localization of fragile X mental retardation protein with the I304N mutation in the RNA-binding domain in cultured hippocampal neurons. *Cell Mol Neurobiol*. **21**(1):29-38.

Cervera R, Balasch J (2008). Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction. *Hum Reprod Upd.* **14**(4): 359–66.

Chen Y, Tassone F, Berman RF, Hagerman PJ, Hagerman RJ, Willemsen R, Pessah IN (2010). Murine hippocampal neurons expressing Fmr1 gene premutations show early developmental deficits and late degeneration. *Hum Mol Genet.* **19:** 196-208.

Ciray HN, Karagenç L, Ulug U, Bener F, Bahçeci M (2008). Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril.* **85:**358-65.

Coffey SM, Cook K, Tartaglia N, Tassone F, Nguyen DV, Pan R, Bronsky HE, Yuhas J, Borodyanskaya M, Grigsby J, Doer Xinger M, Hagerman PJ, Hagerman RJ (2008). Expanded clinical phenotype of women with the FMR1 premutation. *Am J Med Genet A.* **146:**1009–1016

Costa A, Wang Y, Dockendorff TC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Schedl P, Jongens TA (2005). The Drosophila fragile X protein functions as a negative regulator in the orb autoregulatory pathway. *Dev Cell*. **8**(3)**:**331-42.

Costa SS, Fonseca AM, Bagnoli VR, Vianna-Morgante AM (2006). The *FMR1* premutation as a cause of premature ovarian failure in Brazilian women. *Gen Molec Biol*. 29(3): 423-8.

Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF (1986). **Incidence of premature ovarian failure.** *Obstet. Gynecol.* **67: 604**-6.

Cramer DW, Xu H, Harlow BL (1995). Family history as a predictor of early menopause. *Fertil Steril.* **64**(4):740-5.

Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL (2001) FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med.* **3**(5):359-71.

Crinelli R, Antonelli A, Bianchi M, Gentilini L, Scaramucci S, and Magnani M (2000). Selective inhibition of NF-κB activation and TNF-α production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone. *Blood Cells Mol Dis.* **26**: 211–22.

Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell.* **107**(4):489-99.

Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Stefani G, Jones TA, Eddy SR, Darnell RB (2005). Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev.* **19**(8):903-18.

Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Darnell RB (2009). Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. *Hum Mol Genet.* **18**(17):3164-77.

Davis CJ, Davison RM, Payne NN, Rodeck CH, Conway GS (2000). Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect: opinion. *Hum Reprod.* **15**(11):2418-22.

Desphande G, Calhoun G, Schedl P (2006). The Drosophila Fragile X protein, dFMR1, is required during early embryogenesis for pole cell formation and the rapid nuclear division cycles. *Genetics.* **174**(3):1287-98.

Eggermann T, Meschede D, Schuler H, Palm S, Glaser D, Horsthemke B, Eggermann K, Haverkamp F, Zerres K (2005). Premature ovarian failure associated with a small terminal Xq deletion: narrowing the POF1 region down to Xq27.2/Xq27.3-qter. *Clin Genet.* **67**(5):434-7.

Eiges R, Urbach A, Malcov M, Frumkin T, Schwartz T, Amit A, Yaron Y, Eden A, Yanuka O, Benvenisty N, Ben-Yosef D (2007). Developmental Study of Fragile X Syndrome Using Human Embryonic Stem Cells Derived from Preimplantation Genetically Diagnosed Embryos. *Cell Stem Cell*. **1**:568-77.

Ennis S, Ward D, Murray A (2006). Nonlinear association between CGG repeat number and age of menopause in FMR1 premutation carriers. *Eur J Hum Genet*. **14**(2):253-5.

Entezam A, Biacsi R, Orrison B, Saha T, Hoffman GE, Grabczyk E, Nussbaum RL, Usdin K (2007). Regional FMRP deficits and large repeat expansions into the full mutation range in a new Fragile X premutation mouse model. *Gene.* **395**(1-2):125-34.

Epstein AM, Bauer CR, Ho A, Bosco G, Zarnescu DC (2009). Drosophila Fragile X protein controls cellular proliferation by regulating cbl levels in the ovary. *Dev Biol.* **330**(1):83-92.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*. **7:**1342–6.

Fiçicioglu C, Yildirim G, Attar R, Kumbak B, Yesildaglar N (2010). The significance of the number of CGG repeats and autoantibodies in premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online.* **20**(6):776-82.

Fimiani G, Laperuta C, Falco G, Ventruto V, D'Urso M, Ursini MV, Miano MG (2005). Heterozygosity mapping by quantitative fluorescent PCR reveals an interstitial deletion in Xq26.2-q28 associated with ovarian dysfunction. *Hum Reprod.* **21**(2):529-35.

Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, *et al.* (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* **67**(6):1047-58.

García-Alegría E, Ibáñez B, Mínguez M, Poch M, Valiente A, Sanz-Parra A, Martinez-Bouzas C, Beristain E, Tejada MI (2007). Analysis of FMR1 gene expression in female premutation carriers using robust segmented linear regression models. *RNA*. **13**(5):756-62.

Gasiorowski JZ, Dean DA (2007). Intranuclear trafficking of episomal DNA is transcription-dependent. *Mol Ther*. **15**(12):2132-9.

Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R (1995). Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod.* **10:**2427-31.

Gleicher N, Weghofer A, Barad DH (2009). A pilot study of premature ovarian senescence: I. Corretation of tripte CGG repeats on the FMR1 gene to ovarian reserve parameters FSH and anti-Mullerian hormone. *Fertil Steril*. **91**(5):1700-6.

Gleicher N, Weghofer A, Barad DH (2010). Ovarian reserve determinations suggest new function of FMR1 (fragile X gene) in regulating ovarian ageing. *Reprod Biomed Online.* **20**(6):768-75.

Gleicher N, Weghofer A, Lee IH, Barad DH (2011). Association of FMR1 genotypes with in vitro fertilization (IVF) outcomes based on ethnicity/race. PLoS One. 2011 Apr 15;6(4):e18781.

Greco CM, Hagerman RJ, Tassone F, Chudley AE, Del Bigio MR, Jacquemont S, Leehey M, Hagerman PJ (2002). Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain.* **125**(8):1760-71.

Greco CM, Berman RF, Martin RM, Tassone F, Schwartz PH, Chang A, Trapp BD, Iwahashi C, Brunberg J, Grigsby J, Hessl D, Becker EJ, Papazian J, Leehey MA, Hagerman RJ,

Hagerman PJ (2006). Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain.* **129**(1):243-55.

Greco CM, Tassone F, Garcia-Arocena D, Tartaglia N, CoVey SM, Vartanian TK, Brunberg JA, Hagerman PJ, Hagerman RJ (2008). Clinical and neuropathologic findings in a woman with the FMR1 premutation and multiple sclerosis. *Arch Neurol.* **65:**1114–6

Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B, Hagerman PJ (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology.* 57(1):127-30.

Hagerman RJ and Hagerman PJ (2002). The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Devel.* **12:**278–83.

Hagerman PJ, Hagerman RJ (2004). The fragile-X premutation: a maturing perspective. *Am J Hum Genet.* 74(5):805-16.

Hashem V, Galloway JN, Mori M, Willemsen R, Oostra BA, Paylor R, Nelson DL (2009). Ectopic expression of CGG containing mRNA is neurotoxic in mammals. *Hum Mol Genet.* **18(13):**2443-51.

Hergersberg M, Matsuo K, Gassmann M, Schaffner W, Lüscher B, Rülicke T, Aguzzi A (1995). Tissue-specific expression of a *FMR1*/beta-galactosidase fusion gene in transgenic mice. *Hum Mol Genet*. **4(3):**359-66.

Hesters L, Prisant N, Fanchin R, Méndez Lozano DH, Feyereisen E, Frydman R, Tachdjian G, Frydman N (2008). Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization-embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertil Steril.* **89:**1677-84.

Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, Schalling M (1993). Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet.* **3**(1):36-43.

Huang J, Okuka M, McLean M, Keefe DL, Liu L (2008). Effects of cigarette smoke on fertilization and embryo development in vivo. *Fertil Steril.* **92**(4):1456-65.

Hundscheid RD, Sistermans EA, Thomas CM, Braat DD, Straatman H, Kiemeney LA, Oostra BA, Smits AP (2000). Imprinting effect in premature ovarian failure confined to paternally inherited fragile X premutations. *Am J Hum Genet*. **66**(2):413-8.

Hunsaker MR Wenzel HJ, Willemsen R, Berman RF (2009). Progressive spatial processing deficits in a mouse model of the fragile X premutation. *Behav Neurosci.* **123:** 1315-24.

Hunter JE, Epstein MP, Tinker SW, Charen KH, Sherman SL (2008). Fragile X-associated primary ovarian insufficiency: evidence for additional genetic contributions to severity. *Genet Epidemiol.* **32**(6):553-9.

Hutchison, C.J. (2002) Lamins: building blocks or regulators of gene expression? Nat. Rev. *Mol. Cell Biol*., **3**: 848–858.

Iwahashi CK, Yasui DH, An HJ, Greco CM, Tassone F, Nannen K, Babineau B, Lebrilla CB, Hagerman RJ, Hagerman PJ (2006). Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain.* **129**(1):256-71.

Jacquemont, S., Hagerman, R.J., Leehey, M., Grigsby, J., Zhang, L., Brunberg, J.A., Greco, C., Des Portes, V., Jardini, T., Levine, R. et al. (2003). Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am. J. Hum. Genet.,* **72:**869-878.

Jin P, Zarnescu DC, Zhang F, Pearson CE, Lucchesi JC, Moses K, Warren ST (2003). RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in Drosophila. *Neuron.* **39**(5):739-47.

Junqueira LC, Carneiro J (2004). Histologia Básica, 10ª Edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro - RJ.

Kenneson A, Zhang F, Hagedorn CH, Warren ST (2001). Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum Mol Genet.* **10:**1449-54.

Kim SH, Dong WK, Weiler IJ, Greenough WT (2006). Fragile X mental retardation protein shifts between polyribosomes and stress granules after neuronal injury by arsenite stress or in vivo hippocampal electrode insertion. *J Neurosci*. **26**(9):2413-8.

Kunst CB, Leeflang EP, Iber JC, Arnheim N, Warren ST (1997). The effect of FMR1 CGG repeat interruptions on mutation frequency as measured by sperm typing. *J Med Genet.* **34**(8):627-31.

Lavedan C, Grabczyk E, Usdin K, Nussbaum RL (1998). Long uninterrupted CGG repeats within the first exon of the human FMR1 gene are not intrinsically unstable in transgenic mice. *Genomics.* **50**(2):229-40.

Lei L, Zhang H, Jin S, Wang F, Fu M, Wang H, Xia G (2006). Stage-specific germ-somatic cell interaction directs the primordial folliculogenesis in mouse fetal ovaries. *J Cell Physiol*. **208**(3):640-7.

Levenga J, Buijsen RA, Rifé M, Moine H, Nelson DL, Oostra BA, Willemsen R, de Vrij FM (2009). Ultrastructural analysis of the functional domains in FMRP using primary hippocampal mouse neurons. *Neurobiol Dis.* **35**(2):241-50.

Li L, Zheng P, Dean J (2010). Maternal control of early mouse development. *Development.* **137**(6):859-70.

Li Y, Lin L, Jin P (2008). The microRNA pathway and fragile X mental retardation protein. *Biochim Biophys Acta*. **1779**(11):702-5.

Ludwig AL, Hershey JW, Hagerman PJ (2011). Initiation of Translation of the FMR1 mRNA Occurs Predominantly through 5'-End-Dependent Ribosomal Scanning. *J Mol Biol*. **407**:21-34.

Macklon NS, Fauser BCJM (1999). Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Horm Res*. **52**(4):161-70

Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW (2002). Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet.* **11**(24):3007-17.

Meyers CM, Boughman JA, Rivas M, Wilroy RS, Simpson JL (1996). Gonadal (ovarian) dysgenesis in 46,XX individuals: frequency of the autosomal recessive form. *Am J Med Genet.* **63**(4):518-24.

Mila M, Mallolas J (2001). Síndrome del cromosoma X frágil: menopausia precoz. Diagnóstico preimplantacional y preconcepcional. *Rev Neurol.* **33:** Suppl 1:S20-3.

Monzo K, Papoulas O, Cantin GT, Wang Y, Yates JR 3rd, Sisson JC (2006). Fragile X mental retardation protein controls trailer hitch expression and cleavage furrow formation in Drosophila embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(48):18160-5.

Morabia A, Costanza MC (1998). International variability in ages at menarche, first livebirth, and menopause. World Health Organization Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Am J Epidemiol*. **148**:1195-205.

Morris A, Morton NE, Collins A, Macpherson J, Nelson D, Sherman S (1995). An n-allele model for progressive amplification in the FMR1 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(11):4833-7.

Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G, Jacobs P (1998). Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J Med Genet*. **35**:637-40

Murray A, Webb J, MacSwiney F, Shipley EL, Morton NE, Conway GS (1999). Serum concentrations of follicle stimulating hormone may predict premature ovarian failure in FRAXA premutation women. *Hum Reprod.* **14**(5):1217-8.

Murray A, Ennis S, Morton N (2000). No evidence for parent of origin influencing premature ovarian failure in fragile X premutation carriers. *Am J Hum Genet.* **67**(1):253-4.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R (2003). Manipulating the Mouse Embryo. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. pp 186-7.

Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci.* 31(1):137-55.

Napierala M, Michalowski D, de Mezer M, Krzyzosiak WJ (2005). Facile FMR1 mRNA structure regulation by interruptions in CGG repeats. *Nucleic Acids Res.* **33**(2):451-63.

Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brondum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Vaisanen ML, von Koskull H, Sherman SL (2003). Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am J Hum Genet.* **72**(2):454-64.

Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science.* **252**(5010):1097-102.

Omary, M.B., Coulombe, P.A. and McLean, W.H. (2004) Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N. Engl. J. Med.*, **351:** 2087–2100.

Paoletti R, Wenger NK (2003). Review of the International Position Paper on Women's Health and Menopause: a comprehensive approach. *Circulation.* **107**(9):1336-9.

Papoulas O, Monzo KF, Cantin GT, Ruse C, Yates JR 3rd, Ryu YH, Sisson JC (2010). dFMRP and Caprin, translational regulators of synaptic plasticity, control the cell cycle at the Drosophila mid-blastula transition. *Development.* **137**(24):4201-9.

Partington MW, Moore DY, Turner GM (1996). Confirmation of early menopause in fragile X carriers. *Am J Med Genet.* **64**(2):370-2.

Pellicer A, Valbuena D, Bauset C, Albert C, Bonilla-Musoles F, Remohí J, Simón C (1998). The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril.* **69:**1135-41.

Pepper AS, Beerman RW, Bhogal B, Jongens TA (2009). Argonaute2 suppresses Drosophila fragile X expression preventing neurogenesis and oogenesis defects. PLoS One. **4**(10):e7618.

Peprah E, He W, Allen E, Oliver T, Boyne A, Sherman SL (2010). Examination of FMR1 transcript and protein levels among 74 premutation carriers. J Hum Genet. **55**(1):66-8.

Pearson PL, Costa SS, Vianna-Morgante AM. Back to family values: Replacing population based association analysis for mapping menopause genes by a novel family approach. In: 60th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, 2010, Washington.

60th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics - Abstracts, 2010. Abstract #1138.

Primerano B, Tassone F, Hagerman RJ, Hagerman P, Amaldi F, Bagni C (2002). Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations. RNA. **8**(12):1482-8.

Quinn MC, McGregor SB, Stanton JL, Hessian PA, Gillett WR, Green DP (2006). Purification of granulosa cells from human ovarian follicular fluid using granulosa cell aggregates. *Reprod Fertil Dev.* 18(5):501-8.

Rife M, Nadal A, Mila M, Willemsen R (2004). Immunohistochemical FMRP studies in a full mutated female fetus. *Am J Med Genet A.* **124**(2):129-32.

Rizzolio F, Bione S, Sala C, Goegan M, Gentile M, Gregato G, Rossi E, Pramparo T, Zuffardi O, Toniolo D (2006). Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature. *Hum Reprod.* **21**(6):1477-83.

Rodriguez-Revenga L, Madrigal I, Pagonabarraga J, Xuncla M, Badenas C, Kulisevsky J, Gomez B, Mila M (2009) Penetrance of FMR1 premutation-associated pathologies in fragile X syndrome families. *Eur J Hum Genet.* **17:**1359–62

Rohr J, Allen EG, Charen K, Giles J, He W, Dominguez C, Sherman SL (2008).Anti-Mullerian hormone indicates early ovarian decline in fragile X mental retardation (FMR1) premutation carriers: a preliminary study. Hum Reprod. 2008 May;23(5):1220-5.

Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K (1995). Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*. **57**(5):1006-18.

Ross-Inta C, Omanska-Klusek A, Wong S, Barrow C, Garcia-Arocena D, Iwahashi C, Berry-Kravis E, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Giulivi C (2010). Evidence of mitochondrial dysfunction in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Biochem J*. **429**(3):545-52.

Schlessinger D, Herrera L, Crisponi L, Mumm S, Percesepe A, Pellegrini M, Pilia G, Forabosco A (2002). Genes and translocations involved in POF. *Am J Med Genet.* **111**(3):328-33.

Schuettler J, Peng Z, Zimmer J, Sinn P, von Hagens C, Strowitzki T, Vogt PH (2011). Variable expression of the Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) gene in patients with premature ovarian failure syndrome is not dependent on number of (CGG)n triplets in exon 1. *Hum Reprod.* 26(5):1241-51.

Schwartz CE, Dean J, Howard-Peebles PN, Bugge M, Mikkelsen M, Tommerup N, Hull C, Hagerman R, Holden JJ, Stevenson RE (1994). Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study. *Am J Med Genet.* **51**(4):400-2.

Sellier C, Rau F, Liu Y, Tassone F, Hukema RK, Gattoni R, Schneider A, Richard S, Willemsen R, Elliott DJ, Hagerman PJ, Charlet-Berguerand N (2010). Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. *EMBO J.* **29**(7):1248-61.

Shipley GL (2006) *in* Dotak MT (ed). Real-Time PCR. Taylor & Francis Group. New York, NY. pp. 1-38.

Skibsted L, Westh H, Niebuhr E. (1984). X long-arm deletions. A review of non-mosaic cases studied with banding techniques. *Hum Genet*. **57:** 1-5.

Smit L, Borst J (1997). The Cbl family of signal transduction molecules. *Crit Rev Oncog*. **8**(4):359-79.

Spath MA, Nillesen WN, Smits AP, Feuth TB, Braat DD, van Kessel AG, Yntema HG (2010). X chromosome inactivation does not define the development of premature ovarian failure in fragile X premutation carriers. *Am J Med Genet Part A.* **152A**(2):387-93.

Spath MA, Feuth TB, Allen EG, Smits AP, Yntema HG, van Kessel AG, Braat DD, Sherman SL, Thomas C (2011). Intra-individual stability over time of standardized anti-Müllerian hormone in FMR1 premutation carriers. Hum Reprod. May 15. [Epub ahead of print]

Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, Yadav-Shah M, Sherman SL (2005). Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod.* **20:**402–12.

Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ (2000). Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet.* **66**(1):6-15.

Tassone F, Hagerman RJ, Garcia-Arocena D, Khandjian EW, Greco CM, Hagerman PJ (2004a). Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in fragile X associated tremor/ataxia syndrome. *Med Genet.* **41**(4):e43.

Tassone F, Iwahashi C, Hagerman PJ (2004b) FMR1 RNA within the Intranuclear Inclusions of Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome (FXTAS). *RNA Biol.* **1**(2):103-5.

Tassone F, Beilina A, Carosi C, Albertosi S, Bagni C, Li L, Glover K, Bentley D, Hagerman PJ (2007). Elevated FMR1 mRNA in premutation carriers is due to increased transcription. *RNA*. **13**(4):555-62.

Tassone F, Pan R, Amiri K, Taylor AK, Hagerman PJ (2008). A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. *J Mol Diagn.* **10**(1):43-9.

Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini PG, Piomboni P, Focarelli R (2008). Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update.* **14**(2):131-42.

Tay J, Richter JD (2001) Germ cell differentiation and synaptonemal complex formation are disrupted in CPEB knockout mice. *Dev Cell.* **1:** 201-213

Tehrani FR, Shakeri N, Azizi F (2010). Whether age at menopause is predictable using serum anti-Mullerian hormone concentration?. Human Reproduction. 25:i2.

te Velde ER, Dorland M, Broekmans FJ (1998). Age at menopause as a marker of reproductive ageing. *Maturitas*. **30**:119–25.

te Velde ER, Pearson PL (2002). The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update.* **8**(2):141-54.

The Dutch-Belgian Fragile X Consortium [No authors listed] (1994). Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. *Cell*. **78**(1):23-33.

Tibiletti MG, Testa G, Vegetti W, Alagna F, Taborelli M, Dalpra L, Bolis PF, Crosignani PG (1999). The idiopathic forms of premature menopause and early menopause show the same genetic pattern. *Hum Reprod.* **14**(11):2731-4.

Till SM (2010).The developmental roles of FMRP. *Biochem Soc Trans*. **38**(2):507-10.

Torgerson DJ, Thomas RE, Reid DM (1997) Mothers and daughters menopausal ages: is there a link? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* **74**(1):63-6

Turner G, Robinson H, Wake S, Martin N (1994). Dizygous twinning and premature menopause in fragile X syndrome. *Lancet.* **344**(8935):1500.

van Kasteren YM, Hundscheid RD, Smits AP, Cremers FP, van Zonneveld P, Braat DD (1999). Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? *Hum Reprod.* **14**(10): 2455-9.

Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, Galjaard H, Reuser AJ, Hoogeveen AT, Oostra BA (1993). Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature.* **363**(6431): 722-4.

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome (1991). *Cell.* **65**(5):905-14.

Vianna-Morgante AM, Costa SS, Pares AS, Verreschi IT (1996). FRAXA premutation associated with premature ovarian failure. *Am J Med Genet.* **64**(2):373-5.

Vianna-Morgante AM (1999). Twinning and premature ovarian failure in premutation fragile X carriers. Am J Med Genet. 83(4):326.

Vianna-Morgante AM, Costa SS (2000). Premature ovarian failure is associated with maternally and paternally inherited premutation in Brazilian families with fragile X. *Am J Hum Genet.* 67(1):254-5.

Wells DG (2006). RNA-Binding Proteins: A Lesson in Repression. *The J of Neurosc*. **26**(27):7135-8.

Welt CK (2008). Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol.* **68:**499–509.

Wenzel HJ, Hunsaker MR, Greco CM, Willemsen R and Berman RF (2010). Ubiquitin-positive intranuclear inclusions in neuronal and glial cells in a mouse model of the fragile X premutation. *Brain Res.* **1318:** 155-66.

Willemsen R, Hoogeveen-Westerveld M, Reis S, Holstege J, Severijnen LA, Nieuwenhuizen IM, Schrier M, van Unen L, Tassone F, Hoogeveen AT, Hagerman PJ, Mientjes EJ, Oostra BA (2003). The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome. *Hum Mol Genet.* **12**(9):949-59.

Witterberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Roselt A, Welt CK, Rebar RW (2007). The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil. Steril*. **87:** 456-465.

Wood JW (1989). Fecundity and natural fertility in humans. *Oxf Rev Reprod Biol*. **11**:61-109.

World Health Organization Scientific Group (1996). Research on the menopause in the 1990s. 866 pp.

Wu Z, Gall JG (1997). "Micronucleoli" in the Xenopus germinal vesicle. Chromosoma. **105**(7-8):438-43.

Xu XL, Li Y, Wang F, Gao FB (2008). The Steady-State Level of the Nervous-System-Specific MicroRNA-124a Is Regulated by dFMR1 in Drosophila. *J Neurosc*. **28**(46):11883–9

Yang L, Duan R, Chen D, Wang J, Chen D, Jin P (2007). Fragile X mental retardation protein modulates the fate of germline stem cells in Drosophila. *Hum Mol Genet*. **16**(15):1814-20.

Yang Y, Xu S, Xia L, Wang J, Wen S, Jin P, Chen D (2009). The bantam microRNA is associated with drosophila fragile X mental retardation protein and regulates the fate of germline stem cells. *PLoS Genet*. **5**(4):e1000444.

Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D, *et al.* (1991). Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science.* **252**(5010):1179-81.

Zalfa F, Bagni C (2004). Molecular insights into mental retardation: multiple functions for the Fragile X mental retardation protein? *Curr Issues Mol Biol.* **6**(2):73-88.

Zhang L, CoVey S, Lua LL, Greco CM, Schafer JA, Brunberg J,Borodyanskaya M, Agius MA, Apperson M, Leehey M, Tartaglia N, Tassone F, Hagerman PJ, Hagerman RJ (2009). FMR1 premutation in females diagnosed with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psych*. **80:**812–814

Zlotogora, J, Sagi, M, Cohen, T. (1983). The blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome: delineation of two types. *Am. J. Hum. Genet.* **35:** 1020-27.

Recursos da Internet

Brownlab Web Server (BioEdit): http://www.mbio.ncsu.edu

Ensembl Genome Browser: http://www.ensembl.org/index.html

GeneCards: http://www.genecards.org

Gene Codes (Sequencher DNA Software: www.genecodes.com

OMIM (para MIM): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM