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

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

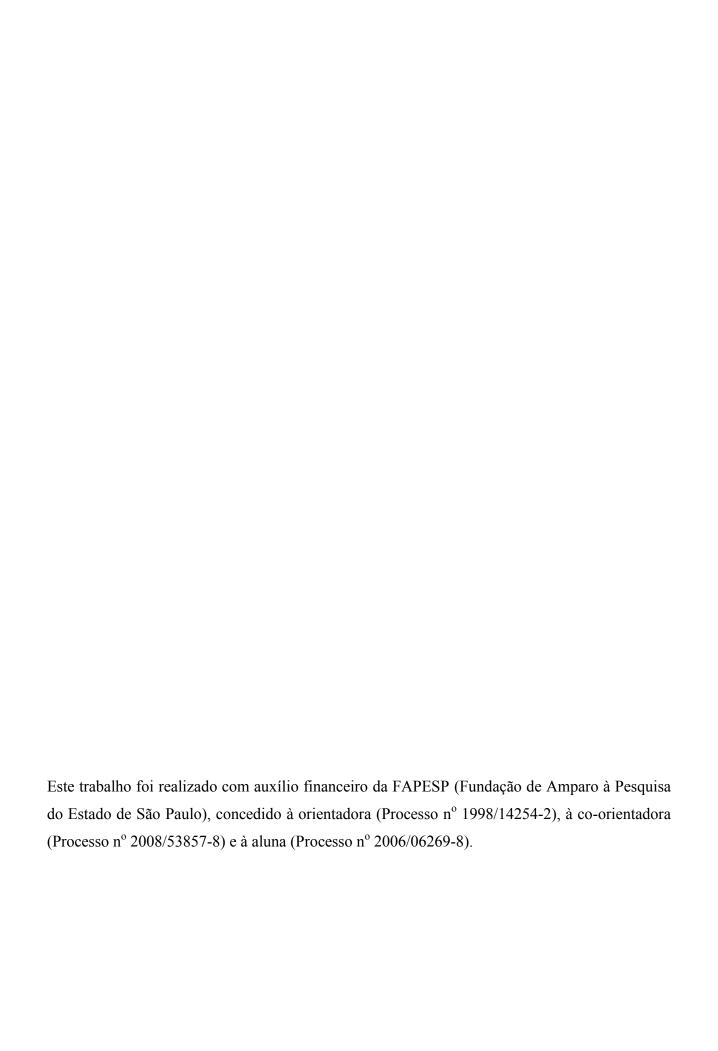
FONTES, LARISSA Análise da expressão do gene *FMR1* no ovário 95 páginas

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	



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.

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 (Early Menopause, 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, Reactive Oxygen Species,), 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 (*Blepharophimosis*, *Ptosis*, *and Epicanthus inversus Syndrome*, 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 (*Follicle-Stimulating Hormone Receptor*, FSHR; MIM 136435), causando disgenesia ovariana hipergonadotrópica, que tem herança autossômica recessiva (Aittomaki e col. 1995).

A pré-mutação do gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 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' UnTranslated Region, 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 (Fragile X Mental Retardation Protein) (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)₄₁₋₆₀ 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, mostrouse 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 (*Sod1 Stem Loop Interacting with FMRP*), 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 (*RNA Induced Silencing Complex*, 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 (*Fragile-X associated Tremor/Ataxia Syndrome*) 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 (*Primary Ovarian Insufficiency*) 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, *Fragile-X associated Primaray Ovarian Insufficiency*).

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)₈₀₋₉₉, 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 prémutação, 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)₃₅₋₅₈, 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)₄₀₋₇₉, 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)_{≥ 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)_{≥ 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 antitireóide (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).

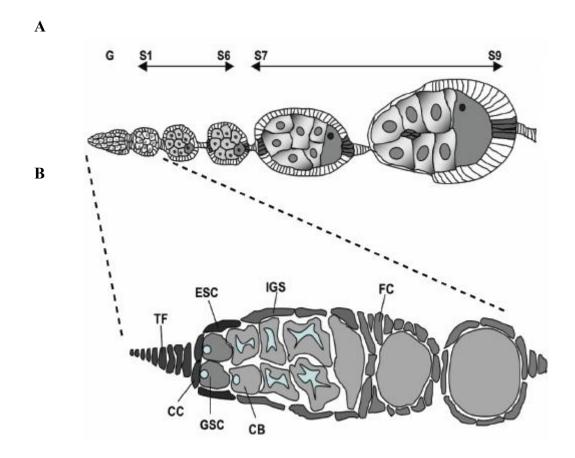


Figura I.1: Diagrama de um ovaríolo de *Drosophila*. Em **A**, etapas da oogênese a partir do germário anterior (G) até o estágio 9 (S1-S9), com o ovócito em desenvolvimento na parte posterior da câmara ovocitária. Em **B**, o germário em detalhe mostrando o filamento terminal (TF) e as células basais (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 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).

A proteína humana ortóloga a orb é a CPEB1 (*Cytoplasmic Polyadenilation Element Binding 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 (Germline Stem Cells, 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* (*Dystrophia Myotonica*

Protein Kinase, MIM 605377) na DM1, quanto a expansão de repetições CCUG no primeiro íntron do gene ZNF9 (ZiNc Finger 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)₁₀₀₋₂₀₀, 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)₅₅₋₉₉, mas essa correlação diminuiu a partir de repetições (CGG)₁₀₀₋₂₀₀. 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)₁₀₀₋₂₀₀. Assim, os níveis de mRNA tendem à normalidade nas mulheres conforme o número de repetições aumenta na faixa de (CGG)₁₀₀₋₂₀₀, 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 prémutação. 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 \alpha B-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 consequência 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 IV

Sumário e Conclusões

Este estudo teve como objetivo geral a análise do gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation gene 1*) quanto a sua relação com a insuficiência ovariana primária (*Fragile X-related Primary Ovarian Insufficiency*, 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 (Fragile X-related Primary Ovarian Insufficiency, 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, 10^a 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