

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**

**Análise do *Splicing* Alternativo nos Éxons 15 e 17 do
Gene FMR1 em Indivíduos Zona *Gray***

Maria Cristina Pamplona da Silva

Florianópolis, Junho de 2010

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**

**Análise do *Splicing* Alternativo nos Éxons 15 e 17 do
Gene FMR1 em Indivíduos Zona Gray**

Maria Cristina Pamplona da Silva

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA/UFSC)

Florianópolis, Junho de 2010

Silva, Maria Cristina P.

Análise do *Splicing* Alternativo nos Éxons 15 e 17 do gene FMR1 em Indivíduos Zona *Gray*.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. *Splicing* alternativo – 2. FMR1 – 3. mRNA – 4. zona *gray*

**Análise do *Splicing* Alternativo nos Éxons 15 e 17 do
Gene FMR1 em Indivíduos Zona Gray**

Maria Cristina Pamplona da Silva

*Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Química no Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina*

*Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador*

*Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química*

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luismar Marques Porto – Presidente (UFSC/CTC/EQA)

Profª. Dra. Fabiana Mortimer Amaral (IFSC)

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto (UFSC/CTC/EQA)

Prof. Dr. Carlos Renato Rambo (UFSC/CTC/EEL)

Florianópolis, SC, Junho de 2010.

Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica da Universidade Federal de Santa Catarina e foi realizado em colaboração com o Laboratório Neurogene, Florianópolis, SC.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Miguel Bento da Silva e Maria Carmen Pamplona da Silva. Obrigada Pai e Mãe por tanto amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Luismar Marques Porto, pela oportunidade de ingressar no Grupo de Engenharia Genômica, pela orientação e por todo conhecimento transmitido.

Faço um agradecimento especial à Ingrid Tremel Barbato, amiga de todas as horas. Ingrid, você proporcionou a realização deste grande sonho, obrigada!

Agradeço à Tânia e a Pricila pelas horas de estudos compartilhadas.

Em especial, meus agradecimentos à Pricila que com muita paciência e dedicação me ensinou a extração de RNA.

As amigas do Laboratório Neurogene, Mariana, Kátia, Maria João, Raquel, Tânia, Pricila, Renata, Dona Célia e Michele que me receberam com tanto carinho.

À Profa. Dra. Gisele Serpa, pela inspiração, orientação e amizade.

À Thais Sincero, do Departamento de Biotecnologia, que ajudou a complementar este trabalho.

Aos colegas do InteLab, em especial à Renata Pertile e Lucélia Serafim pelo companheirismo.

Agradeço o Laboratório Neurogene pelo financiamento desta pesquisa.

Um agradecimento especial aos voluntários e seus familiares que tão gentilmente participaram desta pesquisa.

Obrigada, aos meus pais, meu marido, meu filho, meus irmãos, enfim a toda minha grande e querida família, pelo incentivo e apoio em mais esta etapa de minha vida.

Agradeço a Deus pela oportunidade de mais uma conquista.

RESUMO

Resumo da Dissertação apresentada à UFSC como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Análise do *Splicing* Alternativo nos Éxons 15 e 17 do Gene FMR1 em Indivíduos Zona Gray

Maria Cristina Pamplona da Silva

Junho/2010

Orientador: Prof. Dr. **Luismar Marques Porto**

Área de Concentração: Processos Químicos e Biotecnológicos

Palavras-chave: *splicing* alternativo, FMRP, Síndrome do X-Frágil, gene FMR1.

A presente dissertação tem por objetivo principal analisar o *splicing* alternativo dos éxons 15 e 17 do gene FMR1 (retardo mental do X-Frágil) em indivíduos zona *gray*. O transcrito primário de RNA mensageiro (mRNA) de eucariontes sofre um processo responsável pela união das regiões codificadoras no mRNA maduro. O mecanismo de *splicing* foi descrito pela primeira vez em 1970, sendo responsável pelo “corte” dos *introns* e “emenda” dos *éxons* consecutivos efetuado por um complexo ribonucleoproteico denominado de spliceossomo. O *splicing* alternativo é um importante gerador de diversidade funcional no sistema nervoso central, onde participa da geração de variantes para mais de 80% dos genes. Entre estes está o gene do retardo mental do X-Frágil, cujo transcrito primário pode sofrer *splicing* alternativo de quatro *éxons*, produzindo até vinte isoformas diferentes da FMRP (proteína do retardo mental X-Frágil). Este trabalho foi realizado com a extração de RNA total de sangue periférico de 14 indivíduos jovens do sexo masculino sendo: quatro indivíduos normais para SXF, oito indivíduos zona *gray* e dois indivíduos afetados pela SXF. Para averiguar os tipos de *splicing* alternativo que ocorrem nos éxons 15 e 17 foram usados iniciadores específicos que revelaram seis bandas que representam as seis possíveis isoformas do mRNA nestas regiões. O padrão de bandas encontradas nos indivíduos normais e zona *gray* são similares. Estes resultados sugerem que o “suave” fenótipo típico para

SXF (Síndrome do X-Frágil) que os indivíduos zona *gray* apresentam não está relacionado com o tipo de *splicing* alternativo encontrado nestes indivíduos.

ABSTRACT

Abstract of Dissertation presented to UFSC as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Chemical Engineering.

Analysis of Alternative Splicing in Éxons 15 and 17 of FMR1 Gene in Individuals Gray Zone

Maria Cristina Pamplona da Silva

June, 2010

Advisor: Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Area of Concentration: Chemical and Biotechnological Processes

Key words: Alternative Splicing, FMRP, Fragile X Syndrome, FMR1 gene.

This thesis aims at investigating the alternative splicing of exons 15 and 17 of the FMR1 gene (mental retardation Fragile-X) in individuals gray zone. The primary transcript of messenger RNA (mRNA) in eukaryotes undergoes a process responsible for the joining of coding regions in the mature mRNA. The mechanism of splicing was first described in 1970, being responsible for "cutting" the introns and "amendment" of consecutive exons performed by a ribonucleoprotein complex called the spliceosome. Alternative splicing is an important generator of functional diversity in the central nervous system, which participates in the generation of variants for more than 80% of genes. Among these is the gene of the mental retardation, Fragile X, whose primary transcript can undergo alternative splicing of four exons, producing up to twenty different isoforms of FMRP (protein Fragile X mental retardation). This work was performed by extracting total RNA from peripheral blood of 14 young male being: four normal individual to SXF, eight individuals gray zone and two individuals affected by FXS. To discover the types of alternative splicing that occur in exons 15 and 17 specific primers were used which showed six bands that represent the six possible isoforms mRNA in these regions. The pattern of bands found in normal individuals and gray zone are similar. These results suggest that the "mild" phenotype typical for FXS (Fragile-X

syndrome) that gray zone individual's is not related to the type of alternative splicing found in these individuals.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 25 |
| 1.1. Contextualização e Problema de Pesquisa | 25 |
| 1.2. Objetivo geral..... | 29 |
| 1.3. Objetivos específicos | 29 |
| 1.4. Justificativa | 29 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 31 |
| 2.1. A Síndrome do X-Frágil | 31 |
| 2.2. Sítios Frágeis no Cromossomo X..... | 32 |
| 2.3. Classificação dos Indivíduos Portadores da SXF..... | 33 |
| 2.4. Prevalência Populacional da SXF | 34 |
| 2.5. Características Clínicas e Fenotípicas dos Portadores da SXF .. | 34 |
| 2.6. Mecanismos de Mutação..... | 36 |
| 2.7. O gene FMR1..... | 39 |
| 2.8. A Proteína FMRP..... | 42 |
| 2.9. Indivíduos Zona Gray | 47 |
| 2.10. Splicing do RNA..... | 48 |
| 2.11. Splicing Alternativo | 57 |
| 2.12. Produtos do Splicing Alternativo..... | 60 |
| 2.13. Splicing Alternativo da SXF | 61 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 65 |
| 3.1. Grupo Amostral | 65 |
| 3.2. Coleta de material e extração de RNA | 66 |
| 3.3. Extração de RNA a Partir de Sangue Periférico | 66 |
| 3.4. Obtenção de cDNA | 67 |
| 3.5. Amplificação por RT-PCR..... | 68 |
| 3.6. Desenhando os Iniciadores ou Primers | 68 |

| | |
|---|------------|
| 3.7. Reação de RT-PCR:..... | 71 |
| 3.8. Eletroforese em Gel de Agarose | 71 |
| 3.9. Visualização do Produto de RT-PCR | 71 |
| 4. RESULTADOS | 75 |
| 4.1 Interpretação e Visualização dos Produtos da Amplificação RT-PCR em Géis de Agarose: | 75 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 79 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 85 |
| 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 87 |
| 8. GLOSSÁRIO..... | 89 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 93 |
| ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)..... | 107 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – A figura representa o cromossomo X com suas regiões e em destaque com círculo a região Xq27. | 26 |
| Figura 2 – Representação esquemática do gene FMR1..... | 40 |
| Figura 3 – Alinhamento das proteínas da família da FMRP. | 41 |
| Figura 4 – Quatro resíduos de guanina formando um quarteto G ou tétrades através de ligações de pontes de hidrogênio.. | 43 |
| Figura 5 – A figura indica as regiões dos domínios KH e RGG e os sinais de exportação e importação nuclear encontrados na proteína FMRP..... | 44 |
| Figura 6 – Sequência da proteína FMRP com a localização dos domínios KH1 e KH2 e da região RGG box..... | 45 |
| Figura 7 – Modelo sintetizando as funções propostas para a proteína FMRP em neurônio..... | 46 |
| Figura 8 – Etapas da formação do transcrito primário a partir do DNA..... | 49 |
| Figura 9 – Resultado de alinhamento global obtido com o programa mVista. | 50 |
| Figura 10 – A figura representa um spliceossomo mostrando o <i>splicing</i> do pré-mRNA..... | 52 |
| Figura 11 – Formação do intermediário de lariato..... | 55 |
| Figura 12 – O mecanismo de <i>splicing</i> do RNA..... | 56 |
| Figura 13 – Representação dos diferentes tipos de <i>splicing</i> alternativo..... | 58 |
| Figura 14 – Reconhecimento de <i>éxons</i> no processo de <i>splicing</i> | 60 |
| Figura 15 – Representação da região terminal 3’ do gene FMR1 a partir do <i>éxon</i> 10..... | 62 |
| Figura 16 – Sequência genômica dos <i>éxons</i> 15, 16 e 17..... | 63 |
| Figura 17 – Iniciadores utilizados na RT-PCR..... | 68 |
| Figura 18 – Sequência do gene <i>Homo sapiens</i> fragile X mental retardation 1 (FMR1), mRNA..... | 69 |
| Figura 19 – Regiões de <i>splicing</i> nos <i>éxons</i> 15 e 17 do gene FMR1..... | 72 |

| | |
|---|----|
| Figura 20 – Visualização dos produtos de RT-PCR dos <i>éxons</i> 15 e 17 do gene FMRI..... | 72 |
| Figura 21 – Visualização dos fragmentos amplificados por RT-PCR em gel de agarose dos indivíduos normais e afetados pela SXF.. | 76 |
| Figura 22 – Visualização dos fragmentos amplificados por RT-PCR em gel de agarose dos indivíduos zona <i>gray</i> | 77 |
| Figura 23 – Número de indivíduos encontrados em relação ao tamanho do fragmento encontrado na RT-PCR..... | 83 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Número de repetições CGG e a respectiva classificação para uso do diagnóstico da SXF | 34 |
| Tabela 2 – Representação da relação do número de repetições CGG com a instabilidade da transmissão para as próximas gerações | 48 |
| Tabela 3 – Representação dos sítios que indicam a região correta de <i>splicing</i> do gene FMR1. | 53 |
| Tabela 4 – Número de repetições CGG de cada indivíduo e sua respectiva classificação fenotípica. | 65 |
| Tabela 5 – Descrição das características clínicas dos indivíduos zona <i>gray</i> | 66 |
| Tabela 6 – Tamanho dos fragmentos esperados nas reações de <i>splicing</i> na primeira fase do experimento..... | 73 |
| Tabela 7 – Os indivíduos estudados e o tamanho do fragmento obtido através de RT-PCR..... | 80 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------|---|
| ATP | Trifosfato adenosina |
| AGG | Repetições dos nucleotídeos: adenina, guanina, guanina |
| cDNA | Clone do ácido desoxirribonucléico |
| CGG | Repetições dos nucleotídeos: citosina, guanina e guanina |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| DNTP | Desoxinucleotídeos trifosfato |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| ESE | Amplificador de processamento exônico |
| ESS | Silenciador de processamento exônico |
| FMR1 | Gene <i>Fragile mental retardation 1</i> |
| FMRP | <i>Fragile mental retardation protein</i> |
| FXR1 e 2 | Genes homólogos autossômicos 1 e 2 |
| FXTAS | Síndrome de Tremor/Ataxia Associada ao X Frágil, <i>Fragile X Associated Tremor/Ataxia Syndrome</i> |
| FRAXA | <i>Fragile site, X chromosome, A site</i> |
| FRAXD | <i>Fragile site, X chromosome, D site</i> |
| FRAXE | <i>Fragile site, X chromosome, E site</i> |
| FRAXF | <i>Fragile site, X chromosome, F site</i> |
| hnRNP | <i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i> |
| ISE | Amplificador de processamento intrônico |
| ISS | Silenciador de processamento intrônico |
| KH | <i>K Homology</i> |
| mRNA | RNA mensageiro, <i>Messenger RNA</i> |
| mRNP | Ribonucleoproteína mensageira, <i>Messenger Ribonucleoprotein</i> |

| | |
|---------|--|
| NES | Sinal de exportação nuclear |
| NLS | Sinal de localização nuclear |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| POF | Falha ovariana precoce |
| RGG Box | Sequência arginina-glicina-glicina |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNA-RRM | RNA- <i>recognition motif</i> |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| RT-PCR | Transcriptase reversa-PCR |
| snRNA | <i>Small nuclear</i> RNA |
| snRNP | Pequenas ribonucleoproteínas nucleares |
| SXF | Síndrome do X-Frágil |
| TAE | Tris-acetato-EDTA |
| URT | Região não traduzida, <i>untranslated region</i> |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização e Problema de Pesquisa

Desde o século XIX muitos pesquisadores ficavam intrigados com o número de homens que eram afetados por retardo mental, sendo este número muito superior ao número de mulheres com este problema. Hoje, sabemos que esta diferença deve-se à grande variedade de doenças associadas ao retardo mental presentes em genes situados no cromossomo X. Em meados do século XX, na Inglaterra, J. Purdon Martin e Julia Bell, em 1943, descreveram pela primeira vez problemas mentais ligados a genes no cromossomo sexual. Este tipo de deficiência mental ligada ao sexo foi chamado de Síndrome de Martin-Bell por cerca de 30 anos (Nelson, 1995). Com os avanços dos estudos citogenéticos em 1969, Lubs relatou ter encontrado na região do braço longo do cromossomo X, constricções peculiares em amostras de células em metáfase de pacientes com retardo mental ligado ao cromossomo X. Em 1977, Sutherland descobriu que um meio de cultura deficiente em ácido fólico afetaria a expressão do gene. A partir desta data vários estudos confirmaram que muitos tipos de retardos mentais estavam ligados ao cromossomo X e progressivamente foram sendo definidos os fenótipos associados a esta doença como: problemas cognitivos, físicos e comportamentais. A Síndrome do X-Frágil (SXF) (OMIM 309550) é uma doença genética ligada ao sexo e de caráter pleiotrópico (um gene que possui controle sobre as manifestações de várias características).

A Síndrome do X-Frágil é a causa mais comum de retardo mental herdado e a segunda maior causa de retardo mental de origem genética, sendo a primeira a Síndrome de *Down* (Crawford *et al.*, 2002).

Em 1991, três grupos independentes de pesquisadores, na França, na Holanda e na Austrália, clonaram o gene da SXF, que foi denominado FMR1 (FRAX Mental Retardation 1) (Verkerk *et al.*, 1991; Fu *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991). O produto do gene FMR1 é a proteína FMRP (*Fragile X mental retardation protein*). A proteína FMRP é necessária para o desenvolvimento e funcionamento normal do cérebro, executando um papel essencial tanto na função sináptica como no crescimento dos dendritos (Darnel *et al.*, 2001, Irwin *et al.*, 2001).

A expansão da repetição de uma sequência de trinucleotídeos CGG na região promotora do gene FMR1 (*Fragile X Mental Retardation 1*), situado na região terminal do cromossomo X (Xq27.3), Figura 1, é considerada a causa da doença.

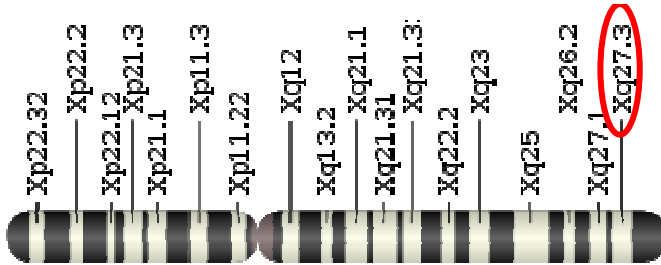


Figura 1 – A figura representa o cromossomo X com suas regiões e em destaque com círculo a região Xq27. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fb/Chromosome_X.svg/125px-Chromosome_X.svg.png

Esta síndrome afeta mais homens do que as mulheres, numa proporção de 1 em cada 3.600 homens e 1 em cada 6.000 mulheres (Crawford *et al.*, 2001). Mulheres afetadas pela Síndrome do X-Frágil, por possuírem dois cromossomos X, podem produzir a proteína FMRP a partir do cromossomo X normal e, quando apresentam comprometimento intelectual, os sintomas são brandos e a deficiência mental é leve (Hagerman e Hagerman, 2002a).

O número de repetições CGG na maioria da população é altamente variável e em indivíduos normais os alelos do gene FMR1 têm variação entre 06 e 40 repetições CGG. A maioria dos indivíduos normais apresenta o número de repetições nos alelos entre 28 e 30 repetições CGG. Entre os indivíduos normais e os indivíduos afetados (mutação completa) com a Síndrome do X-Frágil encontramos os indivíduos *zona gray* e os indivíduos pré-mutados (Crawford *et al.*, 2002). Os indivíduos afetados apresentam mais de 200 repetições de CGG, normalmente acompanhadas de metilação, o que leva à repressão da transcrição do gene e ausência da (proteína) FMRP (Hagerman e Hagerman, 2002).

Indivíduos *zona gray* apresentam entre 41 a 60 repetições de CGG, sendo esta transmissão, geralmente, estável entre gerações. A pré-mutação é caracterizada pela presença de 61 a 200 repetições de CGG e pela transmissão instável entre gerações, que pode levar à mutação completa. A transmissão instável está diretamente relacionada ao número de repetições de CGG: quanto maior a expansão da pré-mutação, maior a probabilidade e transmissão da mutação completa. O padrão de transmissão da pré-mutação para a mutação completa ocorre

quase exclusivamente de mulheres para os seus filhos e filhas. Homens pré-mutados geralmente transmitem apenas a pré-mutação para suas filhas (Eichler, Holden *et al.*, 1994; Crawford *et al.*, 2001; Maddalena *et al.*, 2001).

Como a herança genética da SXF tem caráter pleiotrópico, as características clínicas dos indivíduos portadores da Síndrome do X-Frágil são variáveis. Os sintomas clínicos da doença são retardo mental de grau moderado a severo, presente em 100% dos homens afetados e aproximadamente 60% das mulheres heterozigotas, aspecto facial distinto com orelhas grandes e face alongada, distúrbios de fala, hipermotilidade articular e macrorquidia (Bardoni e Mandel, 2002; Hagerman e Hagerman, 2002; Mandel e Biancalana, 2004). A pré-mutação do gene FMR1 pode causar alguns sinais e sintomas característicos em seus portadores. Em mulheres pré-mutadas a falha ovariana precoce (POF) é mais frequente do que na população em geral (Alligham-HawKins *et al.*, 1999). A POF, definida como menopausa antes dos 40 anos, tem uma frequência de 1% na população em geral (Hagerman e Hagerman, 2002; Hagerman *et al.*, 2004; Sherman 2001; Jacquemont *et al.*, 2005; Van Esch *et al.*, 2005). Homens adultos pré-mutados podem apresentar distúrbios neurológicos típicos denominados de FXTAS (*Fragile X-associate Tremor/Ataxia Syndrome*). O fenótipo da FXTAS foi descrito em cinco homens, que apresentaram tremor iniciando entre os 50 e os 60 anos de idade. Os indivíduos afetados apresentavam tremor, dificuldade para andar, escrever e manusear talheres, e rigidez facial (Hagerman e Hagerman, 2001; Berry-Kravis *et al.*, 2005; Jacquemont *et al.*, 2004a). Outros estudos relacionaram a presença da pré-mutação em crianças do sexo masculino em fase escolar com o déficit de atenção, a hiperatividade e com a ocorrência de autismo (Cornish *et al.*, 2004; Cornish *et al.*, 2005; Farzin *et al.*, 2006), contato visual pobre, comportamento repetitivo como morder as mãos, e ansiedade social (Fisch, 1993).

A confirmação da doença deve ser realizada por diagnóstico clínico seguido de exame genético laboratorial, que é um dos testes mais solicitados de pesquisa de doenças genéticas (Maddalena *et al.*, 2001). O diagnóstico clínico apenas torna difícil a confirmação da doença já que a mesma apresenta diversidade de sintomas e similaridade com outras doenças de comprometimento cognitivo. A confirmação da Síndrome do X-Frágil se faz necessária para se poder iniciar a investigação familiar e o aconselhamento genético das famílias afetadas, diminuindo os riscos de propagação da doença nas gerações futuras (Steiner *et al.*, 2005).

Pacientes portadores da *zona gray* desenvolvem deficiências como distúrbio de aprendizado e comportamento, apesar da mutação relacionada ao número de CGG estar próxima do normal (Mitchell *et al.*, 2005). Além disso, estudos recentes demonstram o aumento da prevalência de indivíduos *zona gray* em especial em populações com necessidades especiais, sugerindo que estes alelos para FMR1 podem estar associados com fenótipos suaves para a SXF (Aileen Kenneson, 2001). Como o número de repetições CGG em indivíduos *zona gray* está muito próximo do normal, talvez o fenótipo “suave” para a SXF não esteja associado ao número de repetições CGG, mas, a uma das isoformas da proteína FMRP produzidas por *splicing* alternativo. Segundo Verkek *et al.*, 1993, existem 12 tipos diferentes de *splicing* alternativo que poderiam formar 12 diferentes mRNAs e 12 possíveis tipos de proteínas. Estes diferentes *splicing* alternativos poderiam codificar diferentes isoproteínas responsáveis pela diversidade funcional do gene FMR1. O gene FMR1 é composto de 17 éxons e sua transcrição é exposta para *splicing* alternativo, que influencia a presença do éxon 12 e 14 e a escolha do sitio acceptor no éxon 15 e 17 (Ashley *et al.*, 1993; Verkek *et al.*, 1993). As diferentes isoproteínas podem estar relacionadas com a manifestação clínica da SXF em indivíduos *zona gray* que apresentam entre 41 e 60 repetições CGG. Os indivíduos *zona gray* não têm o número de repetições considerado dentro do padrão normal e nem o número de repetições considerado dentro do padrão para indivíduo pré-mutado. Muitos experimentos terapêuticos e sócios educacionais para SXF têm sido realizados com êxito, auxiliando o indivíduo afetado a conquistar um bom convívio familiar, escolar e social (Hagerman e Hagerman, 2002b). O entendimento do motivo dos indivíduos *zona gray* apresentarem fenótipos típicos, de indivíduos pré-mutados e de indivíduos afetados, para SXF, mesmo apresentando poucas repetições do trinucleotídeo CGG poderiam auxiliar no tratamento e aconselhamento genético destas famílias.

A Síndrome do X-Frágil faz parte de uma linha de pesquisa do Grupo de Engenharia Genômica da Universidade Federal de Santa Catarina e conta com a colaboração da iniciativa privada do Laboratório Neurogene. As pesquisas iniciaram no ano de 2005, com os trabalhos de mestrado das pesquisadoras Ingrid Tremel Barbato e Mariana Arzua de Queiroz. O trabalho da pesquisadora Ingrid Tremel Barbato teve como objetivo estudar um conjunto de aminoácidos (Face®), através da ingestão, como um produto natural terapêutico sem, no entanto, considerar o efeito individual de seus componentes bioquímicos. A pesquisadora Mariana Arzua de Queiroz avaliou o desempenho de uma

nova metodologia de análise molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR), conhecida como *Enhanced PCR*, no diagnóstico da Síndrome do X-Frágil, e fez um estudo comparativo com a técnica padrão. Em 2008 a pesquisadora Gisele Serpa desenvolveu sua tese de doutorado com o objetivo de contribuir para a compreensão dos elementos reguladores da expressão do gene FMR1 e também incrementar os estudos sobre as funções desempenhadas pela proteína FMRP. Este trabalho é uma sequência desta importante linha de pesquisa sobre a Síndrome do X-Frágil que é a causa mais comum de retardo mental herdado.

1.2. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal analisar o *splicing* alternativo do gene FMR1 nos *éxons* 15 e 17 em indivíduos *zona gray*, usando sangue periférico.

1.3. Objetivos específicos

- Identificar se há relação do tipo de *splicing* alternativo encontrado em cada indivíduo com seu respectivo fenótipo.
- Analisar o padrão de bandas de eletroforese entre os indivíduos *zona gray*.
- Correlacionar os dados obtidos através da extração de RNA em sangue periférico de indivíduos *zona gray*, jovens e do sexo masculino com os dados descritos na literatura através da extração de RNA em córtex cerebral, hipotálamo de fetos humanos e testículos de indivíduos adultos.

1.4. Justificativa

Esta pesquisa se insere em uma linha estratégica de estudos do Grupo de Engenharia Genômica da Universidade Federal de Santa Catarina, que pretende contribuir para a investigação das características moleculares da Síndrome do X-Frágil. Essa estratégia explora os aspectos multidisciplinares dos mecanismos de regulação, diagnóstico e possibilidades de novas abordagens terapêuticas para pacientes

portadores da síndrome e, sobretudo, de indivíduos *zona gray*, cujos efeitos fenotípicos não são facilmente associados à doença genética. Essa população de indivíduos é mais numerosa na população em geral do que os indivíduos afetados e precisam de um estudo mais aprofundado no que se refere ao tipo de proteína que está sendo produzida e sua respectiva funcionalidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Síndrome do X-Frágil

A Síndrome do X-Frágil (SXF) é a causa mais comum de retardo mental herdado e a segunda causa de retardo mental de origem genética, sendo a primeira causa a Síndrome de *Down* (Crawford *et al.*, 2002). Em meados do século XX, J. Purdon Martin e Julia Bell, 1943, descreveram duas gerações de homens afetados por retardo mental e que apresentavam mães com fenótipos normais. A genealogia das famílias sugeria doença relacionada ao cromossomo X. Este tipo de deficiência mental ligada ao sexo foi chamada de Síndrome de Martin-Bell por cerca de 30 anos (Nelson, 1995). Com os avanços dos estudos citogenéticos em 1969, Herbert Lubs observou o sítio frágil no braço longo do cromossomo X. Vários estudos foram feitos e confirmando assim que havia uma forma de retardo mental ligada ao cromossomo X. Nos anos 70, pesquisadores associaram a herança ligada ao cromossomo X ao retardo mental, com o aumento do volume dos testículos (macroorquidismo) em alguns homens (Turner *et al.*, 1975). Em 1977, Sutherland descobriu que um meio de cultura deficiente em ácido fólico afetaria a expressão do gene. A partir desta data vários estudos confirmaram que muitos tipos de retardos mentais estavam ligados ao cromossomo X e progressivamente foram sendo definidos os fenótipos associados a esta doença como: problemas cognitivos, físicos e comportamentais. A Síndrome do X-Frágil (SXF) (OMIM 309550) é uma doença genética ligada ao sexo e de caráter pleiotrópico.

A SXF ocorre devido a uma mutação dinâmica no cromossomo X, com padrão hereditário particular, envolvendo uma instabilidade na expansão das repetições dos trinucleotídeos CGG, na região 5' UTR (região não traduzida) do gene FMR1, localizado na região terminal do cromossomo X, em Xq 27.3. Para que a síndrome ocorra, a expansão deve conter mais de 200 repetições de CGG e apresentar uma hipermetilação de ilha CpG, resultando o silenciamento do gene FMR1 e a ausência da proteína FMRP, ocasionando assim a chamada mutação completa (H. Van Esch, 2006).

A Síndrome do X-Frágil afeta tanto homens como mulheres, mas nestas o quadro clínico é em geral menos grave. Como o gene FMR1 está no cromossomo X, o menino sempre herda de sua mãe o único gene FMR1 que possui. A menina, que tem dois genes FMR1, herda um gene no cromossomo X que recebe da mãe e o outro no cromossomo X que

herda do pai. O funcionamento desse gene normal pode, ou não, ser suficiente para que não ocorram sintomas da Síndrome do X-Frágil (Carvalho, 2003).

Os estudos sobre a transcrição do gene FMR1 mostraram que os indivíduos com o gene normal e aqueles com a pré-mutação produzem igualmente o mRNA. Já nos indivíduos afetados o mRNA não é detectado por análise molecular, mostrando que o gene está silencioso. Este silêncio do gene está associado com a expansão da repetição do trinucleotídeo CGG na extremidade 5' UTR do gene FMR1 (Pozdnyakova e Regan, 2005). Esta expansão causa metilação irreversível do DNA, silenciando a expressão gênica e levando a uma redução substancial nos níveis da proteína codificada por este gene, denominada FMRP (Gardner e Sutherland, 2004).

Sequências presentes no início de vários genes se mantêm desmetiladas quando o gene está ativo. Nos genes que não estão ativos, por exemplo, no cromossomo X inativo das mulheres, essas sequências estão metiladas. Nos genes do cromossomo X dos homens, que está sempre ativo essas regiões estão desmetiladas. Mas no caso da mutação completa do gene FMR1, a ilha CpG está sempre metilada mesmo no cromossomo X ativo (Hansen *et al.*, 1992).

A SXF por muito tempo foi caracterizada apenas por retardo mental de grau variável, sem associação com outras características fenotípicas. Atualmente vários sinais físicos e comportamentais foram observados em indivíduos afetados, caracterizando um quadro clínico mais amplo para esta síndrome. A fala e a escrita são funções severamente afetadas nas crianças portadoras da SXF (Hagerman *et al.*, 1986).

2.2. Sítios Frágeis no Cromossomo X

A nomenclatura sugerida para o sítio do gene é FRAXA, onde o F e o A indicam que é do tipo “ácido fólico”, o R significa raro, o X significa que o *locus* está localizado no cromossomo sexual X e o A é devido ao gene ser o FMR1 (Hecht *et al.*, 1989). A denominação “Síndrome do X-Frágil” é utilizada quando se refere à expansão de CGG no gene FMR1, sítio FRAXA e seu fenótipo característico.

Três novos sítios frágeis muito próximos ao FRAXA foram identificados. Um deles, o FRAXD, localizado na região Xq27.2, posição muito próxima ao sítio de retardo mental Xq27.3 (FRAXA), pode estar presente em cariótipo de indivíduos normais e geralmente não

está associado a manifestações clínicas da SXF. O outro sítio frágil é denominado de FRAXE que está relacionado a uma mutação no gene FMR2, região Xq28, e contém uma repetição de trinucleotídeos (CCG)_n instável, cuja expansão é responsável pelo fenótipo de retardo mental. O sítio FRAXF que não causa, aparentemente, qualquer fenótipo anormal, também está localizado na região Xq28, onde foi identificada a presença de repetições de CGG. A avaliação citogenética pode ser dificultada pela presença destes sítios frágeis localizados em regiões muito próximas no cromossomo X (Ramos *et al.*, 1992; Parrish *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1997). A distinção entre FRAXA, FRAXD, FRAXE e FRAXF requer o uso de técnicas da genética molecular (Sarafidou *et al.*, 2004).

2.3. Classificação dos Indivíduos Portadores da SXF

Existem quatro categorias de alelos para o gene FMR1 baseados no número de repetições CGG e na estabilidade de transmissão do gene para as futuras gerações que são denominadas de: normal, zona *gray*, pré-mutado e afetado (Crawford *et al.*, 2001). O indivíduo portador da mutação completa (afetado) é aquele que apresenta mais de 200 repetições de nucleotídeos CGG acompanhadas de hipermetilação. O indivíduo pré-mutado é aquele que apresenta entre 61 a 200 repetições de nucleotídeos CGG e associado com grande risco de favorecer expansão para mutação completa na próxima geração. O indivíduo *zona gray* é aquele que apresenta alelos com 41 a 60 repetições CGG, Tabela 1, com possível instabilidade na transmissão da mutação para a próxima geração. Os indivíduos *zona gray* recebem esta denominação, porque não caracterizam um indivíduo normal, mas também não constituem uma pré-mutação. O risco de expansão da pré-mutação durante a meiose feminina está correlacionado ao tamanho real da repetição (FU *et al.*, 1991, HEITZ *et al.*, 1992). Indivíduos normais possuem entre 6 a 40 repetições CGG (Crawford *et al.*, 2001). A maioria da população apresenta entre 28 a 30 repetições CGG (Crawford *et al.*, 2001; Maddalena *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Número de repetições CGG e a respectiva classificação para uso do diagnóstico da SXF. Fonte: Crawford *et al.*, 2001.

| Número de repetições CGG | Classificação |
|---------------------------------|----------------------------|
| 6 A 40 repetições de CGG | Normal |
| 41 A 60 repetições de CGG | <i>Zona Gray</i> |
| 61 A 200 repetições de CGG | Pré-mutação |
| > 200 CGG | Mutação completa (afetado) |

A classificação conforme o número de repetições CGG não está bem estabelecido e varia dependendo do autor. Por exemplo, Hagerman e Hagerman, (2004), classificam de 6 a 44 repetições CGG como indivíduo normal, de 45 a 54 como indivíduos zona *gray*, de 55 a 200 como indivíduo pré-mutado e de 200 a milhares repetições CGG como indivíduo portador de mutação completa. É importante considerar as características clínicas e o histórico familiar de cada indivíduo, pois pequenas diferenças, quatro ou cinco repetições de CGG, provavelmente não definem isoladamente a classificação (Hagerman e Hagerman, 2004).

2.4. Prevalência Populacional da SXF

A prevalência mais utilizada para indivíduos afetados é de aproximadamente 1/4000 homens e de 1/8000 mulheres (Hagerman *et al.*, 1992). A prevalência estimada em homens pré-mutados é de 1/810, e de 1/257 mulheres na população normal (Sherman, 2002).

2.5. Características Clínicas e Fenotípicas dos Portadores da SXF

A SXF está associada a várias anormalidades físicas e cognitivas de grau moderado a severo, em 100% dos homens afetados e cerca de 60% das mulheres heterozigotas (Bardoni e Mandel, 2002; Hagerman e Hagerman, 2002; Mandel e Biancalana, 2004).

Deficiência mental, alterações no comportamento, face alongada, orelhas grandes, anormalidades no tecido conjuntivo, aumento do

volume testicular em homens em idade pós-puberal, hipotonia, autismo, contato visual pobre, problemas afetivos, estereótipos com as mãos, ansiedade social e falha ovariana precoce em mulheres fazem parte do quadro clínico da SXF (Pozdnyakova e Regan, 2005). As manifestações nem sempre ocorrem e a existência de portadores de alteração no gene FMR1 sem manifestações clínicas aparentes dificultam o diagnóstico da SXF baseado apenas na avaliação clínica.

A deficiência mental é a principal manifestação clínica dos indivíduos afetados pela SXF com um comprometimento significativo das funções cognitivas e de adaptação social (Reiss *et al.*, 1995). O indivíduo afetado apresenta uma limitação das capacidades de aprendizagem, da habilidade de expressão e realização de tarefas. A SXF contribui entre 15 a 20% dos casos de deficiência mental ligada ao cromossomo X (Maes *et al.*, 2000). Em mulheres portadoras da SXF há uma menor prevalência de deficiência mental, estando ampla maioria dessas mulheres nas categorias de inteligência limítrofe e de deficiência mental moderada (Tassone *et al.*, 2000).

Aproximadamente 20% das mulheres pré-mutadas são afetadas por POF (Falha Ovariana Precoce) antes dos 40 anos (Sherman, 2000). A POF (MIM: 311360) é definida por falha ovariana precoce ocorrendo antes dos 40 anos afetando aproximadamente 1% das mulheres (Santoro, 2003; Bretherick *et al.*, 2005) e sua etiologia é ainda desconhecida na maioria dos casos. Relatos anteriores indicam a alta incidência de POF entre portadoras pré-mutadas do gene FMR1 (Allingham-Hawkins *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 2005). Resultados similares foram obtidos analisando a prevalência de pré-mutação do gene FMR1 em população POF. Além disso, diversas famílias POF mostram a co-segregação da pré-mutação FMR1 e POF, deste modo reforçando a associação observada (Marozzi *et al.*, 2000). Estudos moleculares relatam a significativa associação positiva entre o tamanho da repetição dos nucleotídeos CGG com a disfunção ovariana, concluindo que mulheres portadoras de pré-mutação para FMR1 tem um aumento de risco da POF, sugerindo que não somente o aconselhamento genético mas também o aconselhamento de fertilidade pode ser requerido para avaliação de planejamento familiar (Bodega *et al.*, 2006).

Homens adultos portadores de pré-mutação para a SXF podem apresentar alterações neurológicas denominadas de FXTAS (*Fragile X Associated Tremor/Ataxia Syndrome*) (Hagerman *et al.*, 2004; Jacquemont *et al.*, 2006). Esta síndrome inicia nos homens por volta dos 50 anos ou mais e se caracteriza por patologia neurológica progressiva. Estudos em homens pré-mutados nos Estados Unidos, Holanda e

Austrália mostram uma relação entre a FXTAS com 20 a 30 % de indivíduos com alelos pré-mutados. As características da FXTAS incluem tremor, dificuldade na marcha e no equilíbrio, ansiedade e perda de memória. Não foi encontrada relação entre os achados neuropatológicos e o número de repetições CGG (Jacquemont *et al.*, 2004b; Greco *et al.*, 2006). O menor número de repetições em indivíduos com a pré-mutação do gene FMR1 observado em associação com o fenótipo de ataxia e/ou tremor é de 51 repetições de CGG. Acima de 100 repetições de CGG os indivíduos apresentam grandes chances de apresentar problemas emocionais e comportamentais (Jacquemont *et al.*, 2004; Hagerman e Hagerman, 2004). Provavelmente, o fenótipo é causado pelos altos níveis de mRNA. Não é possível estabelecer tratamento para a FXTAS, pois ainda é desconhecida a patogênese molecular desta síndrome. Os medicamentos existentes apenas amenizam os sintomas da doença (Jacquemont *et al.*, 2004; Baba e Uitti, 2005).

Os testes de DNA são os métodos empregados para detecção da SXF. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o Southern Blotting são os métodos de escolha para a classificação das isoformas ou variantes da SXF. A análise de repetições de CGG do gene FMR1 através de PCR (Brown *et al.*, 1993) é a técnica mais acessível e é utilizada, atualmente, como um teste de triagem. Quando há necessidade de investigar o gene expandido usa-se o Southern Blotting (Oostra *et al.*, 1993).

Algumas síndromes podem estar associadas à SXF ou apresentar co-morbidades como: síndrome de *Asperger*, síndrome de *Prader-Willi*, síndrome de *Pierre Robin*, síndrome de *Down*, síndrome de *Klinefelter* e microcromossomo extra (Sutherland, 1985). Algumas síndromes apresentam características físicas semelhantes à SXF como: síndrome de *Coffin-Lowry* (orelhas proeminentes), síndrome de *Lujan* (macroorquidismo) e a síndrome de *Atkin* (orelhas grandes e macroorquidismo) (Arena e Lubs, 1991). Nestes casos há necessidade de testes adequados para obtenção de um diagnóstico diferencial.

2.6. Mecanismos de Mutação

A mutação presente na SXF apresenta uma herança com penetrância incompleta tanto em homens quanto em mulheres portadores da mutação. Podemos observar este tipo de herança nos homens portadores desta mutação que transmitem para seus netos

através de suas filhas, mas aparentemente não são afetados (Hagerman, 1999). Um fato que chama atenção na SXF é o aumento da probabilidade de deficiência mental nas futuras gerações. Este fenômeno ficou conhecido na literatura como o “*Paradoxo de Sherman*” (Sherman *et al.*, 1984). Esta SXF é causada predominantemente pela expansão da repetição do trinucleotídeo CGG na região 5' UTR do gene FMR1. Acima de 200 cópias da repetição ocorre inativação do gene e aparece o retardo mental. Os indivíduos afetados mostram a ausência do produto do gene FMR1 que é a proteína FMRP (Fu *et al.*, 1991; Verkek *et al.*, 1991).

A transmissão dos alelos para a mutação completa ocorre diretamente de mães com mutação completa ou de mães com pré-mutação. Os fatores associados com a instabilidade da transmissão de alelos pré-mutados para mutação completa são variados. Não ocorre expansão de pré-mutação para mutação completa na meiose masculina, então os pais pré-mutados não transmitem para suas filhas a mutação completa (Reyniers *et al.*, 1993). O risco da expansão da pré-mutação para mutação completa está associado com o número de repetições CGG nas mães. Quanto maior o número de repetições das sequências CGG maior é o risco da expansão para a mutação completa (Nolin *et al.*, 2003). Uma mulher com uma pré-mutação de 60 repetições de CGG tem uma chance pequena de ter uma criança afetada, ao passo que se a pré-mutação for de 90 ou mais repetições de CGG a chance é de aproximadamente 90% (Flannery *et al.*, 1995); O número de repetições CGG do gene FMR1 é polimórfico e na população normal varia entre 6 e 40 repetições. A sequência CGG geralmente apresenta em alelos normais duas ou mais interrupções AGG nas posições 10 e 20 das repetições CGG que conferem estabilidade ao gene. Portadores de pré-mutação e mutação completa possuem repetições maiores com a presença de uma ou nenhuma inclusão AGG. A perda das interrupções AGG parece influenciar na instabilidade da expansão do gene FMR1 (Eichler *et al.*, 1996). A expansão mitótica da repetição de CGG é maior nos homens. Por este motivo, os filhos de mulheres pré-mutadas têm expansões muito maiores que as filhas (Flannery *et al.*, 1995).

Um grupo de pesquisadores relatou um caso onde o avô materno apresentava o alelo no padrão zona gray com 52 repetições CGG. A filha deste homem também é portadora de um alelo pré-mutado (ou *zona gray, depende da classificação*) com 56 repetições CGG e um alelo normal com 34 repetições CGG. Foi observado que o filho desta mulher tinha uma expansão de um alelo para mutação completa com aproximadamente 538 repetições CGG. Curiosamente, as duas

interrupções AGG presentes no alelo do avô não foram encontradas no alelo pré-mutado (ou *zona gray*) de sua filha. O pai deste jovem afetado apresenta alelo com 23 repetições CGG e a sua irmã apresenta um alelo com 23 repetições CGG e o outro alelo com 91 repetições CGG (pré-mutado). Estas observações chamam a atenção do risco de indivíduos *zona gray* em duas gerações apresentarem netos com alelos para mutação completa (Fernandez-Carvajal *et al.*, 2009). Anterior a esta descoberta, o menor número de repetições de CGG encontrado em uma pré-mutação, capaz de, na próxima geração, levar a uma mutação completa era de 59 repetições CGG (Nolin *et al.*, 2003).

Um mesmo indivíduo pode apresentar diferentes tamanhos de repetições de CGG em seus tecidos (instabilidade somática) fenômeno denominado de mosaïcismo. Aproximadamente 15% dos indivíduos afetados apresentam um tipo de variação somática onde a pré-mutação está associada à mutação completa sendo esta instabilidade a mais encontrada nos tecidos (Maddalena *et al.*, 2001). Alguns indivíduos apresentam outro tipo de mosaïcismo chamado de mosaïcismo de metilação da repetição, ou seja, algumas células têm metilação da repetição CGG e outras células não apresentam (Hagerman *et al.*, 1994). Todos os homens afetados com mosaïcismo possuem menor comprometimento mental do que os indivíduos com mutação completa (Cohen *et al.*, 1996). Entretanto, outros estudos mostram que não há diferença no grau de deficiência mental entre indivíduos com mosaïcismo e sem mosaïcismo (Wiegers *et al.*, 1993).

Diminuições no tamanho das repetições são muito raras (Mingroni netto *et al.*, 1996). Em alguns casos, o número das repetições de CGG em mutação completa apresenta-se menor na prole de mulheres com a mutação completa (Oberlè *et al.*, 1991, Chiurazzi *et al.*, 1994). Contrações de um alelo de mutação completa para a forma de pré-mutação também já foram observadas (FU *et al.*, 1991, Chiurazzi *et al.*, 1994). Van den Ouwenland *et al.* (1994) constataram a contração da forma da pré-mutação para a forma normal do gene FMR1 em uma filha de mulher portadora de pré-mutação.

A SXF também pode ser causada por mutações que levam à perda da função do gene FMR1 (Jin e Warren, 2003; Oostra e Willemsen, 2003; Mandel e Biancalana, 2004), como mostram os exemplos a seguir. Lugenbeel *et al.*, 1995, relataram duas diferentes mutações intra-gênicas que são a causa da perda de função no gene FMR1. No primeiro caso, uma deleção de um resíduo de arginina na posição 373 (códon thr125) no *éxon 5*, resultou em parada prematura de tradução do gene FMR1. O segundo caso era o de um paciente adulto

que apresentava o fenótipo clínico clássico da SXF, incluindo o macroorquidismo. A sequência do *éxon 2* mostrou uma mudança de 2 pares de bases levando a formação de um códon de parada.

Em três pacientes não aparentados, Wang *et al.*, (1997), encontraram uma transição C-T no nucleotídeo 14 do *íntron 10* do gene FMR1 que resultou na remoção total do *éxon 10*, unindo assim os *éxons 9* e *11* durante o processo de transcrição. Esta mutação resultou em parada na tradução removendo regiões conservadas do gene que codificam os domínios KH2 e o bloco RGG da proteína FMRP. Atualmente a perda do *éxon 10* é denominada de polimorfismo do gene FMR1 (Wang *et al.*, 1997).

De Boulle *et al.*, 1993, descrevem um paciente com fenótipo da SXF devido a uma mutação de novo no códon 367 onde uma substituição T-A converte o códon ATT para AAT. Esta mutação é conhecida como ILE367ASN. Uma substituição similar identificada no códon 304, que resulta em um quadro clínico severo, é conhecida como ILE304ASN (Feng *et al.*, 1997).

2.7. O gene FMR1

O gene FMR1 apresenta aproximadamente 40 Kpb de comprimento, com 17 *éxons*, e mostra-se conservado do ponto de vista evolutivo, desde os invertebrados. O sequenciamento do gene detectou em humanos 185.775 pares de bases no gene FMR1 (GenBank, número de acesso L29074). Ele é responsável pela transcrição de um mRNA de 3,9 Kpb, cujo produto proteico foi detectado em todos os tipos de células analisadas, especialmente no cérebro e gônadas (Bardoni *et al.*, 2001). A transcrição do gene FMR1 apresenta *splicing alternativo* originando doze mRNAs diferentes e doze possíveis isoformas proteicas, detectadas em diferentes tecidos. A mais longa isoforma proteica contém 632 resíduos de aminoácidos (Eichler *et al.*, 1993; Verkerk *et al.*, 1993). O promotor do gene FMR1 encontra-se numa ilha CpG, de cerca de 1Kpb. A transcrição é iniciada em três locais diferentes ao longo do promotor. Observando a Figura 2 observamos a região promotora do gene FMR1 mostrando algumas proteínas reguladoras que possuem sítios de interação nesta região, os sítios Sp1, um sítio Nrf-1 e um sítio E-box. Já os fatores USF e Max funcionam como repressores da expressão gênica. Membros da família CREB/ATF de fatores de transcrição ligam-se ao E-box existente à montante do gene FMR1. Os CREB e Nrf-2 contribuem para a expressão do gene

FMR1. Os sítios anteriores à repetição CGG, são utilizados tanto em alelos normais quanto naqueles onde há pré-mutação, mas em proporções diferentes. Quanto maior a repetição maior o predomínio de utilização nos sítios iniciadores mais distais à repetição, indicando que a seleção de local de iniciação é influenciada pelo elemento CGG (Beilina *et al.*, 2004).

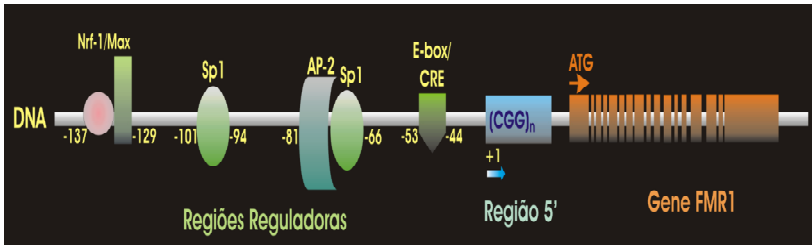


Figura 2 – Representação esquemática do gene FMR1. Região promotora do gene FMR1 mostrando algumas proteínas reguladoras que possuem sítios de interação nesta região, os sítios Sp1, um sítio Nrf-1 e um sítio E-box. Já os fatores USF e Max funcionam como repressores da expressão gênica. Membros da família CREB/ATF de fatores de transcrição ligam-se ao E-box existente à montante do gene FMR1. Os CREB e Nrf-2 contribuem para a expressão do gene FMR1. Fonte: Serpa, 2008.

Nos indivíduos que apresentam o alelo com mutação completa do gene FMR1 tem sido observado um padrão variável de metilação. Esta observação sugere que os padrões de metilação, tanto em indivíduos normais como em afetados são variados. Em indivíduos com o alelo para mutação completa, há a presença de um número variável de células onde não ocorre a metilação, garantindo a expressão gênica em diferentes níveis, influenciando o fenótipo (Tassone *et al.*, 1999).

A sequência CGG repetida apresenta em alelos normais duas ou mais interrupções AGG esparsas que, quando presentes, conferem estabilidade à mesma. A estabilidade das repetições é determinada pelo comprimento da repetição pura e pela presença das inclusões AGG, ocorrendo a cada dez cópias CGG. Portadores de pré-mutação e mutação completa possuem repetições maiores com a presença de uma ou nenhuma inclusão AGG (Dombrowski *et al.*, 2004).

O gene FMR1 apresenta dois homólogos autossômicos, FXR1 e FXR2 (Zhang *et al.*, 1995) mapeados na posição 3q28 e 17p13.1,

respectivamente. Os indivíduos com a SXF que têm déficit ou ausência da proteína FMRP apresentam níveis normais das proteínas codificadas pelos genes FXR1 e FXR2. Além de interagirem entre si, as três proteínas interagem com ribossomos no processo de síntese proteica. Nenhuma patologia ou defeito foi associado com os genes FXR1 e FXR2, mas considerando a significativa homologia presente, a falta destas proteínas deve resultar em efeitos fenotípicos similares. Teoricamente é possível que indivíduos com o fenótipo da SXF que apresentam o alelo normal do gene FMR1 bem como níveis normais da proteína FMRP possam ter anormalidades no gene FXR1 ou no gene FXR2 (Siomi *et al.*, 1996).

Os três membros desta família possuem grande similaridade de sequência entre si, cerca de 55%, Figura 3, codificam para proteínas com domínios funcionais principais que interagem entre si no núcleo e no citoplasma, como heterodímeros ou homodímeros. Estes domínios protéicos são responsáveis pela interação da FMRP com outros elementos protéicos e ribonucléicos, definindo suas funções no SNC (sistema nervoso central) (Zhang *et al.*, 1995; Kirkpatrick *et al.*, 2001).

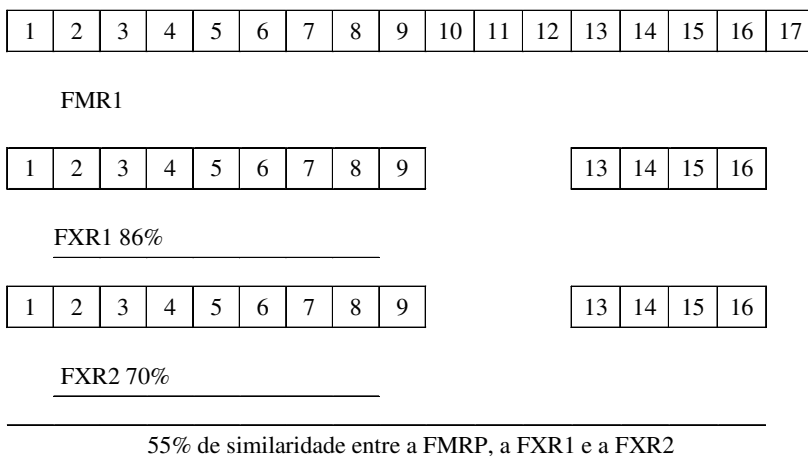


Figura 3 – Alinhamento das proteínas da família da FMRP. A FMRP possui respectivamente 86% e 70% de similaridade na região compartilhada com as outras integrantes da família, FXR1 e FXR2. Estas não possuem a sequência codificada pelos *éxons* 10 a 12 e 17 do gene FMR1. Adaptado de Zhang *et al.*, 1995.

Os indivíduos que são portadores da pré-mutação mostram níveis mais altos de mRNA comparados aos indivíduos normais (Hagerman e Hagerman, 2001). Experimentos mostram que homens que carregam 55 a 100 repetições de CGG têm níveis de mRNA quatro vezes maior que indivíduos normais. Indivíduos que apresentam de 100 a 200 repetições de CGG têm estes níveis aumentados de quatro para até dez vezes. As mulheres, em menor proporção do que os homens, também apresentam níveis de mRNA aumentados (Primerano *et al.*, 2002; Oostra *et al.*, 2003).

Acredita-se que o aumento da transcrição presente nos pré-mutados seja resultante da expansão das repetições de CGG e do aumento do número de fatores de transcrição, que são atraídos pelas repetições de CGG. Estes fatores atuam como acentuadores da transcrição (Oostra e Willemsen, 2003). Os indivíduos que são pré-mutados apresentam níveis da proteína FMRP normais ou baixo, mesmo apresentando grande quantidade do mRNA do gene FMR1. Em resposta aos baixos níveis de FMRP, ocorre um aumento na transcrição, elevando os níveis do transcrito do gene FMR1 (Primerano *et al.*, 2002; Oostra e Willemsen, 2003; Beilina *et al.*, 2004; Tassone *et al.*, 2004).

2.8. A Proteína FMRP

A proteína FMRP está presente no tecido fetal e adulto. Ela é predominantemente expressa no cérebro e nas gônadas. A proteína FMRP, de 70-80 kD, é encontrada predominantemente no citoplasma (Devys *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1997) e está presente em todos os neurônios de indivíduos normais estudados, mas ausente (ou presente em pequena quantidade) em células nervosas não neuronais.

Apesar da localização citoplasmática, a FMRP apresenta sinal de localização nuclear (NLS), codificado pelo *éxon 5*, e sinal de exportação nuclear (NES), codificado pelo *éxon 14*, o que sugere movimentação entre núcleo e citoplasma (Bardoni *et al.*, 1997). Esta hipótese foi confirmada por estudos de microscopia eletrônica, os quais mostraram que a FMRP é capaz de atravessar os poros nucleares. Embora a função exata desta proteína ainda não seja conhecida, suas propriedades e localização sugerem que ela esteja envolvida na regulação do transporte, na estabilidade e na tradução de alguns mRNAs (Sung *et al.*, 2000; Schaeffer *et al.*, 2003). A regulação na tradução não está completamente esclarecida, mas envolve a repetição CGG na 5' UTR do mRNA de FMR1. Acredita-se que as expansões dos nucleotídeos de CGG formem

estruturas suficientemente estáveis, capazes de interferir no início da tradução (Hagerman e Hagerman, 2002; Tassone e Hagerman, 2003).

A capacidade de a FMRP ligar-se ao seu próprio mRNA e a outros mRNAs, através dos motivos da proteína, deve-se à presença de uma estrutura, na fita simples de alguns mRNAs, conhecida como quartetos G ou tétrades G, que são guaninas que se unem por ligações do tipo pontes de hidrogênio formando um quadrado. Como aproximadamente 4% do total de mRNAs do cérebro de fetos humanos têm esse tipo de estrutura, é possível que a FMRP interaja com um grande número de mRNAs (Darnell *et al.*, 2001; Oostra, 2002; Chen *et al.*, 2003b; Denman, 2003; Huang e Richter, 2004).

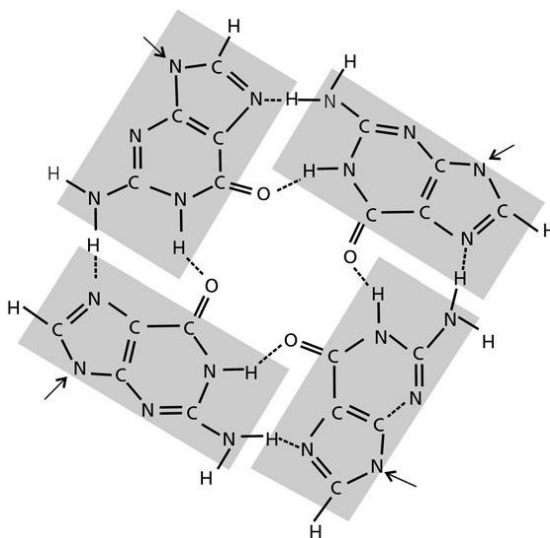


Figura 4 – Quatro resíduos de guanina formando um quarteto G ou tétrades através de ligações de pontes de hidrogênio. Fonte: <http://www.cead.ueg.br>. Acessado em 07/06/2010.

A Figura 5 mostra os tipos de domínios de ligação a RNAs que foram identificados na FMRP, que são os domínios KH (Homólogo a ribonucleoproteína heterogênea nuclear, hnRNPk, codificados pelos *éxons* 8, 9 e 13) e um domínio RGG (codificado pelo *éxon* 16) contendo a sequência conservada *arg gly gly* (arginina, glicina, glicina) (Oostra e Willemsen, 2003). A sequência da FMRP mostra também os sinais de localização e de exportação nucleares (NLS e NES) (Siomi *et al.*, 1993; Bardoni *et al.*, 1997).

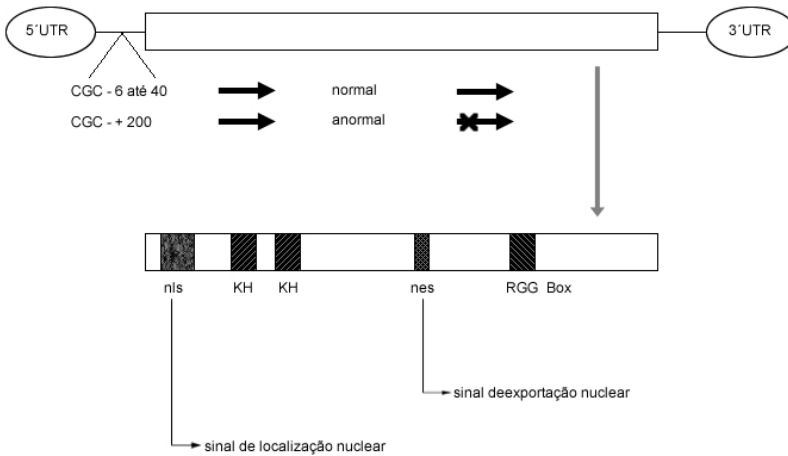


Figura 5 – A figura indica as regiões dos domínios KH e RGG e os sinais de exportação e importação nuclear encontrados na proteína FMRP. Fonte: <http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.canoadetolda.org.br/biolmol/Genetica>. Acessado em 30/07/2009 com modificações.

A importância do domínio KH para a propriedade funcional da FMRP é ilustrada pelo raro e único paciente identificado com a mutação, ILE304ASN, localizada no segundo domínio KH, causando alteração na estrutura quaternária desta região da proteína (De Boulle *et al.*, 1993).

Apresenta-se a seguir a Figura 6 que mostra a sequência da proteína FMRP com a localização dos domínios KH1 e KH2 e da região RGG box.

MEELVVEVRG SNGAFYKAFV KDVHEDSITV AFENNWQPDR QIPFHDVRFPPVGYNKDIN

ESDEVEVYSR ANEKEPCCWW LAKVRMIKGE FYVIEYAACD ATYNEIVTIE RLRSVNPKNP

ATKDTFHKIK LDVPEDLRQM CAKEAAHKDF KKAVGAFSVT YDPENYQLVI LSINEVTSKR

AHMLIDMHFR SLRTKLSLIM RNEEASKQLE SSRQLASRFH **EQFIVREDLM GLAIGHTGAN**

Domínio KH1

IQQARKVPGV TAIDLDEDTCTFHIYGEDQD AVKKARSFLE FAED **VIQVPR NLVGKVIKGN**

Domínio KH2

GKLIQEIVDK SGVV RVRIEA ENEKNVPQEE EIMPPNSLPS NNSRVGPNAP EEKHLDIKE

NSTHFSQPNS TKVQRVLVAS SVVAGESQKP ELKAWQGMVP FVFGTKDSI ANATVLLDYH

LNYLKEVDQL RLERLQIDEQ LRQIGASSRP PPNRTDEKES YVTDDGQGMG RGSRPYRNRG

HGRRRPGYTS GTNSEASNAS ETESDHRDEL SDWSLAPTEE ERESFLRRGD GRR **RGGGGRG**

RGG-Box

QGGRRGG.GF KGNDHSRTD NRPRNPREAK GRRTDGLSQI RVDCNNERSV HTKTLQNTSS

EGSRLRTGKD RNQKKEKPPDS VDGQQPLVNG VP

Figura 6 - Sequência da proteína FMRP com a localização dos domínios KH1 e KH2 e da região RGG box.

Provavelmente, a FMRP desempenha funções diversas como: movimento de RNAs entre o núcleo e o citoplasma, transporte de RNAs nos dendritos, na tradução e regulação proteica nos dendritos (Jin e Warren, 2003; Jin *et al.*, 2004; Pozdnyakova e Regan, 2005), como mostra a Figura 07.

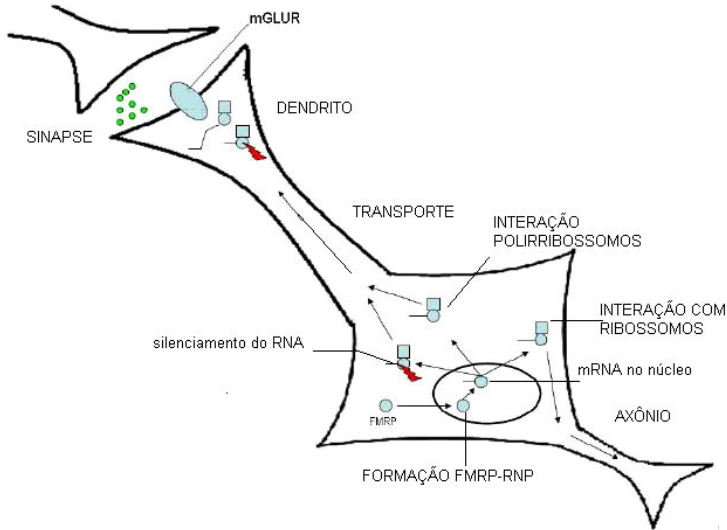


Figura 7 – Modelo sintetizando as funções propostas para a proteína FMRP em neurônio. Fonte: Jin *et al.*, 2004.

Segundo Jontes e Smith, (2000), a expressão da FMRP é especialmente elevada nos neurônios do hipocampo, do córtex cerebral e do cerebelo, relacionando-se diretamente com a SXF e a FXTAS. Nos neurônios do hipocampo e do córtex cerebral a FMRP predomina nas espinhas dendríticas, que são evaginações da membrana pós-sináptica sujeitas a alterações morfológicas relacionadas à função sináptica e plasticidade neuronal, que são dependentes de síntese protéica.

Cérebros de indivíduos com SXF apresentam anormalidades nas espinhas dendríticas que se mostram mais longas e finas do que o normal sugerindo que a FMRP deva ter uma função na maturação e/ou eliminação sináptica (Nimchinsky *et al.*, 2001).

O mRNA do gene FMR1 também está situado nos dendritos onde se associa a FMRP (Greenough *et al.*, 2001). Provavelmente a FMRP inibe a tradução de mRNA de maneira específica e seletiva (Li *et al.*, 2001).

Diferentes isoformas proteicas da expressão do gene FMR1 estão presentes nos mesmos tecidos. O *splicing* alternativo não aparece em tecidos específicos, mas a abundância dos diversos transcritos pode ser visualizada em diferentes tecidos (Verkeij *et al.*, 1993, Verkek *et al.*, 1993; Ashley *et al.*, 1993a).

2.9. Indivíduos Zona Gray

Indivíduos *zona gray* são usualmente definidos somente pelo tamanho da repetição de CGG que varia entre 41 a 60 repetições (Crawford *et al.*, 2001). Estes indivíduos não são associados com transmissões instáveis para mutação completa e/ou serem pais de crianças com SXF (Crawford *et al.*, 2002; Nolin *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2002). Falta clareza na distinção entre pré-mutados e indivíduos *zona gray* na literatura pesquisada.

Indivíduos *zona gray* podem apresentar algumas deficiências como distúrbios comportamentais e dificuldades de aprendizagem mesmo estando muito próximos do padrão normal para as repetições CGG. Num estudo na Tasmânia, foi relatado que 3,45% de meninos com necessidade de educação especial tinham alelos na faixa *zona gray* (Mitchell *et al.*, 2005). Crawford *et al.*, (1999), apresentaram resultados similares, ou seja, 4,4% de meninos com necessidade de educação especial tinham alelos na faixa *zona gray*, em população de americanos da raça branca. Alguns autores interpretam como coincidência a dificuldade de aprendizagem ou algum atraso no desenvolvimento com a classificação *zona gray* destes indivíduos. Segundo, Mitchell *et al.*, (2005) é necessário ficar atento à presença de dificuldades de aprendizagem que podem estar relacionadas à SXF. Estudos recentes mostram aumento da prevalência de indivíduos *zona gray* em especial em populações com necessidades especiais sugerindo que estes alelos do gene FMR1 podem também estar associados com fenótipos suaves da SXF (Kenneson *et al.*, 2001).

O estudo da transmissão da mutação de indivíduos *zona gray* tem mostrado que a transmissão geralmente é estável. A transmissão nestas famílias pode apresentar contração ou expansão no tamanho da repetição de CGG. A instabilidade da transmissão aumenta com o aumento do número das repetições de CGG, conforme mostrado na Tabela 2.

O risco de expansão não pode ser facilmente determinado por causa de nossa incapacidade de diferenciar alelos *zona gray* estáveis de alelos pré-mutados instáveis, esta distinção só é possível pela observação da transmissão para futuras gerações (Eichler *et al.*, 1994).

Tabela 2 – Representação da relação do número de repetições CGG com a instabilidade da transmissão para as próximas gerações. Fonte: Nolin *et al.*, 2003.

| Número de repetições CGG | Aumento da instabilidade |
|--------------------------|--------------------------|
| 49 a 54 | 19,0% |
| 55 a 59 | 30,9% |
| 60 a 65 | 80,0% |

Estudos com mulheres do Canadá com o alelos para *zona gray* variando entre 41 a 54 repetições CGG mostram a presença da interrupção AGG. A presença da interrupção AGG (confere estabilidade ao gene) sugere que a perda da interrupção é um evento tardio na expansão de repetições CGG (Oostra e Willemsen, 2003).

Carvajal *et al.*, (2009) relataram um caso onde o avô materno apresentava o alelo no padrão *zona gray** com 52 repetições CGG. A filha deste homem também é portadora de alelo *zona gray** com 56 repetições CGG. Foi observado que o filho desta mulher tinha uma expansão de um alelo para mutação completa com aproximadamente 538 repetições CGG. Curiosamente, as duas interrupções AGG presentes no alelo do avô não foram encontradas no alelo da mãe. Estas observações chamam a atenção do risco de indivíduos *zona gray* em duas gerações apresentarem netos com alelos para mutação completa.

2.10. *Splicing do RNA*

Nas células eucariontes o processo de transcrição do DNA ocorre no núcleo formando o RNA que será transportado para o citoplasma, onde ocorrerá o processo de tradução. A formação do mRNA inicia com uma modificação na extremidade 5' gerando uma ligação 5'–5' com ponte tri-fosfato, seguida da metilação da guanosina, que recebe o nome de região Cap. A região Cap confere ao RNA uma maior estabilidade e aumenta a chance de ele ser capturado pelos sistemas de tradução. Do transcrito primário do RNA serão removidas as sequências não codificantes pelo processo de *splicing*. *Splicing* é um processo de “corte e emenda” do transcrito primário de RNA. Para finalizar, a região 3' do

* A classificação conforme descrito por Crawford *et al.*, 2001.

RNA sofre clivagem sendo adicionada uma cauda poli-A, que é uma sequência de adeninas, Figura 8, (Alberts *et al.*, 2002).

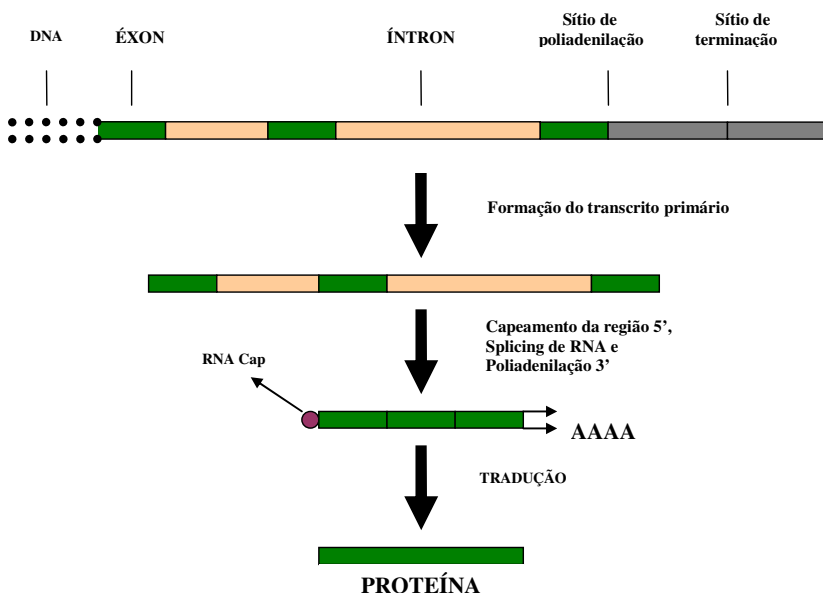


Figura 8 – Etapas da formação do transcrito primário a partir do DNA. Ocorrência de modificações em ambas as extremidades do RNA com a adição da região Cap na extremidade 5' e poliadenilação da extremidade 3'. Remoção das sequências intrônicas pelo processo de *splicing* em *cis*.

O *splicing* descrito neste processo de formação do RNA é denominado de *splicing* em *cis*, com a remoção dos íntrons (Figura 8), formando uma molécula de mRNA maduro. O mecanismo de *splicing* é responsável pela expressão gênica em eucariontes.

Os genes humanos apresentam um tamanho médio de 27 mil pares de nucleotídeos onde cerca de 1.300 pares de nucleotídeos são usados para codificar uma proteína de tamanho médio com cerca de 430 aminoácidos. O restante de DNA presente no gene são segmentos não codificantes. As sequências codificantes denominadas de éxons são intercaladas por longas sequências não codificantes denominadas de íntrons (Alberts *et al.*, 2002).

Os *éxons* apresentam um tamanho médio de 145 pares de nucleotídeos e sua identificação é bastante difícil, assim como

identificar o início e o fim de um gene. O termo *íntron* é usado para a sequência intragênica e o termo *éxon* é usado para a sequência gênica expressa. O modelo do gene eucarionte seria como um mosaico de sequências gênicas em que os *éxons* teriam a função de acelerar a evolução das espécies, formando novas proteínas a partir de proteínas existentes (Gilbert, 1978). Em 1979 Blake definiu *íntrons* como sequências intercaladas e sugeriu que *éxons* individuais são pequenas unidades peptídicas funcionais, domínios ou dobramentos da cadeia peptídica.

A identificação dos *éxons* é baseada nas sequências que são altamente conservadas durante a evolução. Em geral as regiões conservadas apresentam *éxons* funcionalmente importantes e sequências reguladoras. As sequências reguladoras têm a função de garantir que o gene seja expresso nos níveis, no momento e no tipo celular adequado. O estudo das regiões conservadas é feito a partir da comparação de sequências do genoma humano com regiões correspondentes em genomas relacionadas com outras espécies através de técnicas de genômica comparada (Figura 9).

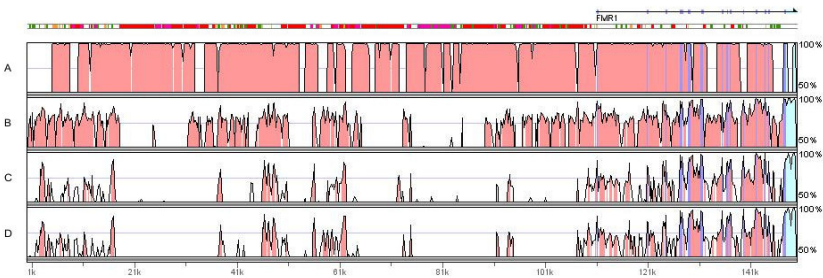


Figura 9 – Resultado de alinhamento global obtido com o programa mVista. As quatro linhas representam o alinhamento global entre a sequência à montante e codificante do gene FMR1 humano alinhada com a sequência homóloga: (A) *Pan troglodites*, (B) *Canis familiaris*, (C) *Rattus norvegicus* e (D) *Mus musculus*. Os picos indicam os níveis de conservação ao longo das sequências. As regiões marcadas de azul correspondem aos *éxons* do gene FMR1 humano e dos genes homólogos. Cada linha apresenta a comparação da sequência genômica de uma espécie com a sequência humana de interesse (Fonte: Serpa, 2008).

Cerca de 60% dos genes humanos sofrem *splicing*, ocorrendo assim à formação de diferentes proteínas a partir de um único gene. O *splicing* permite que o genoma humano aumente o seu potencial codificante. Fazendo mapeamento nos genes da ovoalbumina de galinha, beta globina de coelho e cadeia leve de imunoglobulina murina, observou-se que as sequências de DNA possuíam segmentos intragênicos ausentes em seus transcritos (Brack e Tonegawa, 1977; Doel *et al.*, 1977). Esta e outras observações evidenciaram que segmentos contíguos no RNA estavam interrompidos no DNA (Brack e Tonegawa, 1977; Dunn e Hassell, 1977). De acordo com estes estudos o cístron, uma sequência gênica que dá origem a uma sequência polipeptídica, não poderia mais ser considerado um modelo único.

Vários modelos foram propostos para explicar a formação do mRNA a partir de sequências transcritas de um gene com interrupções (Sambrook, 1977) como: saltos pela RNA polimerase entre sequências gênicas, recombinação de DNA que serviria de molde para a RNA polimerase, transcrição independente de segmentos de um mesmo gene, seguida da união dos transcritos e formação de um único mRNA e a existência de um pré-mRNA que por “cortes e união de fragmentos formaria um mRNA maduro sendo este uma sequência mais curta que o seu precursor. Era consenso geral que a provável formação do mRNA envolvia um mecanismo de “corte e emenda” de segmentos de ácidos nucléicos, processo este denominado de *splicing* (Crick, 1979).

A formação do mRNA é feita a partir da transcrição do pré-mRNA que apresenta as regiões de éxons e íntrons. As sequências de íntrons serão removidas pelo processo denominado de *splicing* do RNA. Os íntrons têm um tamanho bastante variado podendo apresentar de 10 a mais de 100 mil nucleotídeos. O *splicing* do RNA é realizado por moléculas de RNA muito pequenas conhecidas como snRNAs (small nuclear RNAs) ricas em uracila e apresentam cinco tipos: U1, U2, U4, U5 e U6. Estudos revelaram que os snRNAs foram identificados como integrantes de um complexo ribonucleoproteico que participam do processo de *splicing* (Lerner *et al.*, 1980). No início os estudos mostravam que havia um conjunto proteico comum para os snRNAs formando as snRNPs (*small nuclear ribonucleoprotein particles* ou pequenas ribonucleoproteínas nucleares). Atualmente mais de 150 peptídeos diferentes já foram identificados nesses complexos (Zhou *et al.*, 2002; Schellenberg *et al.*, 2008). Os snRNPs junto com proteínas formam o spliceossomo. O spliceossomo (Figura 10) é responsável pelo *splicing* do pré-mRNA de uma célula.

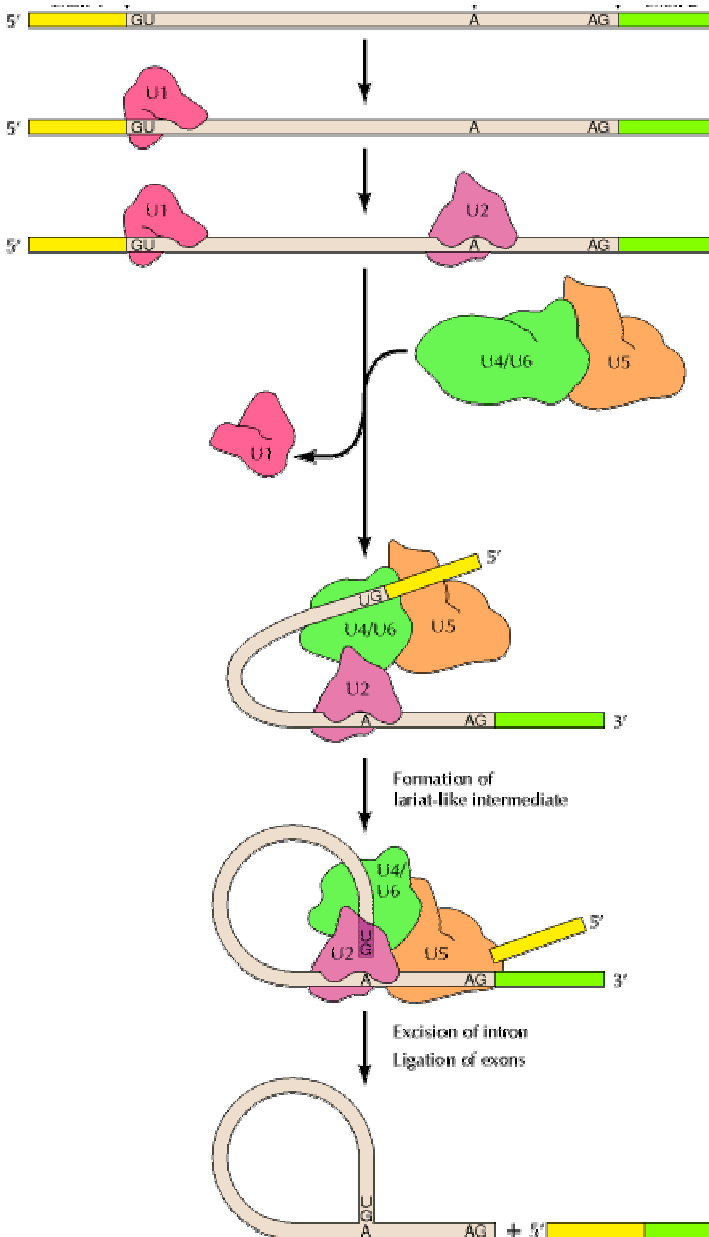


Figura 10 – A figura representa um spliceossomo mostrando o *splicing* do pré-mRNA. Fonte: Alberts *et al.*, 2002.

Foi verificado que as junções entre éxons e íntrons continham sequências curtas com similaridades intra e intergênicas, que deveriam sinalizar onde ocorreria o *splicing*. O mesmo foi analisado nos limites entre íntrons e éxons (Catterall *et al.*, 1978). As similaridades iam além das bases conservadas no início e o fim de cada íntron marcado pelos nucleotídeos **GT** no fim e pelos nucleotídeos **AG** no início de cada íntron (Tabela 3).

Tabela 3 – A tabela representa os sítios que indicam a região correta de *splicing* do gene FMR1. Tscr é a pontuação do *éxon* e depende do tamanho do I/Ac (pontuação relativa ao sinal de iniciação ou Splice da extremidade 3' do *éxon*), do DO/T (pontuação pelo *splice* na região 5' do *éxon* ou sinal de terminação) e do CodRg (pontuação pela região codificante).

| Do registro L29074 do GenBank Entrez Nucleotide | | Três bases de cada lado da fronteira da sequência do GenBank (LETRAS MAIÚSCULAS no CDS, minúsculas no íntron) | | Dos "genes/éxons previstos" pelo GENSCAN | |
|---|------------------|---|---|--|----------------------------|
| CDS nº | Resíduos CDS nºs | Fim do íntron/início do CDS Sítio de corte 5' (sítio receptor) | Fim do CDS/início do íntron Sítio de corte 3'(sítio doador) | Dos "genes/éxons previstos" pelo GENSCAN | Tscr ("pontuação de éxon") |
| | | | | 18245 – 18284 Prom | -6.85 |
| 1 | 13962 - 14012 | aag/ATG | AAG/gta | 19907 - 19945 Init | 2.25 |
| 2 | 23715 - 23767 | cag/GCA | CAA/gta | 23715 – 23767 Intr | 5.79 |
| 3 | 27322 - 27415 | cag/CTG | GAG/gtg | 27322 - 27415 Intr | 6.55 |
| 4 | 30104 - 30175 | tag/GTG | GAG/gta | | |
| 5 | 30441 - 30589 | tag/GTG | TTG/gtg | 30441 – 30589 Intr | 13.81 |
| 6 | 31731 - 31824 | tag/TCC | GAG/gta | 31731 – 31824 Intr | 9.35 |
| 7 | 31911 - 32027 | cag/AGT | GAG/gta | 31911 – 32027 Intr | 8.44 |

| | | | | | |
|----|---------------|---------|---------|-----------------------|-------|
| 8 | 34208 - 34378 | tag/GAT | TAG/gta | 34208 – 34378 Intr | 9.82 |
| 9 | 34468 - 34546 | tag/GCA | GAG/gta | 34468 – 34546 Intr | 3.21 |
| 10 | 38287 - 38396 | aag/GAA | AGG/gta | 38287 – 38396 Intr | 7.68 |
| 11 | 39249 - 39383 | tag/GTG | CAG/gta | 39249 – 39383 Intr | 2.34 |
| 12 | 39882 - 39944 | cag/GAT | AAG/gtg | 39882 – 39944 Intr | 2.90 |
| 13 | 42359 - 42445 | tag/GAA | CAG/gta | 42359 – 42445 Intr | 3.95 |
| 14 | 44915 - 45110 | tag/GAA | AGG/gta | 44915 – 45110 Intr | 15.77 |
| 15 | 46653 - 46835 | cag/ATT | AAG/gta | 46653 – 46835 Intr | 11.24 |
| 16 | 47318 - 47400 | tag/GAA | CAG/gta | 47219 – 47400 Intr | 11.87 |
| 17 | 50467 - 50628 | tag/ATC | TAA/act | 50467 – 50628 Term | 11.85 |
| | | | | 52396 – 52401 PlyA | 1.05 |

Através de estudos *in vitro* foi possível o entendimento deste processo. O *splicing* é um mecanismo que envolve duas etapas. A primeira etapa envolve a clivagem no sítio intrônico 5' (Ruskin *et al.*, 1984); em seguida ocorre a ligação do fosfato na extremidade 5' a uma adenosina (Konarska *et al.*, 1985).

Inicialmente o processo de *splicing* foi identificado com a participação dos snRNPs U1 e U2. A extremidade 3' intrônica teria o potencial de se alinhar com o snRNA U1 (Rogers e Wall, 1980). O snRNA U2 teria maior potencial de complementaridade com sequências exônicas e com a extremidade 3' intrônica. Estudos posteriores confirmaram ser o snRNA U2 responsável pelo reconhecimento do sítio 3' intrônico ou receptor de *splicing*. Estes dados sugerem que U1 e U2 têm funções independentes. (Parker *et al.*, 1987). Foi verificado que a ação dos snRNPs U4 e U6 é essencial para este processo, porém ocorrem independente de U1 e U2 (Berget e Robberson, 1986). Os snRNPs U4 e U6 formam um complexo que se liga ao snRNP U5 e este complexo de três partes se associará ao complexo A onde estão os snRNPs U1 e U2 ligados, respectivamente, entre aos sítios doador e receptor de *splicing* com o *intron* do hnRNA (Konarska e Sharp, 1987). A formação do complexo dos cinco snRNPs forma o spliceossomo.

Alterações internas por maior afinidade entre novos membros deste complexo permitem a formação da primeira reação do *splicing*, mediada por U2 e U6, que é a formação do intermediário de lariato (Figura 11). O intermediário de lariato é um RNA que apresenta uma estrutura em laço que tem um único nucleotídeo, uma adenosina, no ponto de ramificação. A união da adenosina, através de uma ligação fosfodiéster convencional, 3'-5', com a base seguinte de uma forma não convencional, 2'-5', na extremidade 5' intrônica forma o intermediário de lariato.

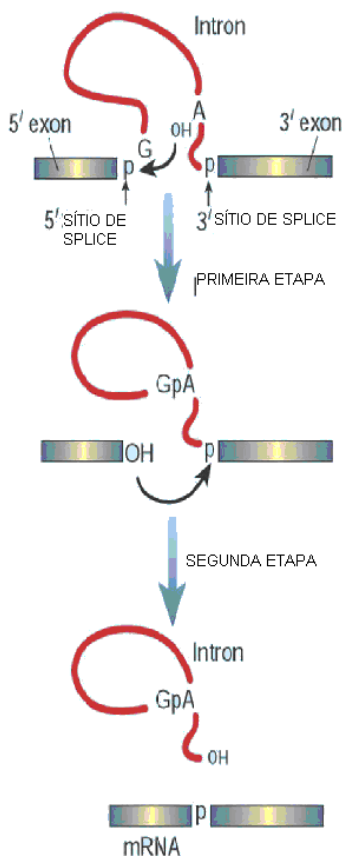


Figura 11 – Formação do intermediário de lariato, com a união dos éxons formando o mRNA. Fonte: www.nature.com/.../n68571/images/413695aa.2.jpg, acesso em 09/11/2009.

A segunda reação não depende mais do snRNP U1 e é caracterizada pela união dos éxons consecutivos com a liberação e separação entre as subunidades e o spliceossomo (Konarska e Sharp, 1987). Foram evidenciadas duas proteínas que são importantes para a hibridação dos snRNAs U1 e U2, respectivamente, nos sítios doador e receptor de *splicing* denominadas de fator auxiliar de U2 (U2AF35 e U2AF65) que têm a função de reconhecer o sítio receptor de *splicing* (Zamore e Green, 1990). A interação do fator auxiliar U2AF é dependente do dinucleotídeo AG (Wu *et al.*, 1999) (Figura 12).

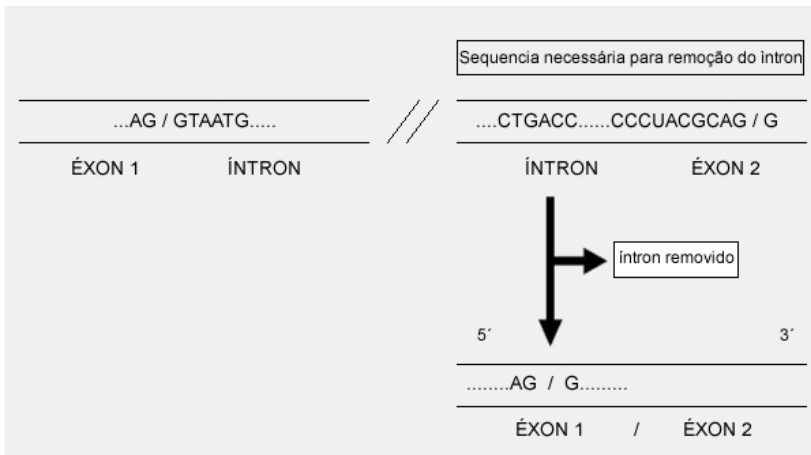


Figura 12 – O mecanismo de *splicing* do RNA que é realizado com muita precisão e envolve uma série de etapas que inicia com o spliceossomo reconhecendo os sinais de *splicing* de um pré-mRNA. A remoção dos *introns* envolve três sítios que apresentam uma região de consenso que indicam para a célula a correta região de *splicing*. Fonte: A autora.

O complexo denominado spliceossomo é necessário devido à distância existente entre os sítios de *splicing* nos *introns*. Este processo ocorre através de duas reações de transesterificação. Assim, ocorrerá a formação do mRNA formado apenas por sequências exônicas na ordem da sequência genômica (Padgett *et al.*, 1986).

A plasticidade do *splicing* de RNA permite que a célula monte diferentes proteínas. Uma mutação ao acaso pode levar a uma alteração no padrão de *splicing* não ocorrendo a remoção de um *intron*, ou ainda,

ocorrendo a retirada de um *éxon* total ou parcialmente. O processo de *splicing* evoluiu no sentido de encontrar o melhor padrão para evitar erros na montagem do RNA e qualquer mutação neste local poderá acarretar numa procura do melhor padrão possível para iniciar este processo. Além da formação de proteínas diferentes através do *splicing* por mutações ao acaso, também pode ocorrer o *splicing* alternativo onde um gene forma diferentes proteínas em diferentes tecidos e em diferentes momentos do desenvolvimento do indivíduo.

2.11. *Splicing* Alternativo

A maioria dos genes de eucariotos superiores codifica RNAs que podem formar por *splicing* alternativo dois ou mais RNAs diferentes que geram produtos proteicos diferentes. Um exemplo é o gene de uma proteína muscular de mamíferos, a troponina T. O RNA processado gera dois RNAs maduros alternativos onde cada produto apresenta quatro *éxons*. Em cada um dos dois RNAs, um *éxon* diferente é eliminado, então, os dois RNAs maduros têm três *éxons* em comum e um diferente (Watson *et al.*, 2006).

A partir de vários exemplos de genes que formam mais de uma variante de RNA mensageiro definiu-se o termo *splicing* alternativo. Este termo explica as alternativas de uso regulado dos sítios de *splicing*, com a inclusão ou a exclusão total ou parcial dos *éxons* formando variantes de mRNA originadas de um mesmo gene. Os diferentes mRNAs formam variantes proteicas denominadas isoformas (Hanke *et al.*, 1999).

A Figura 13 mostra os principais tipos de *splicing* alternativo.

Vários fatores influenciam a escolha correta do sítio de *splicing* ou o fortalecimento dos sítios de *splicing* como: a estrutura secundária do RNA nascente, o tamanho do *éxon*, a processividade da polimerase de RNA e sequências acessórias (Ast, 2004). As sequências acessórias são fatores importantes nos eventos de *splicing* regulado. São sequências curtas, muito variáveis e podem ser ricas em purinas na sequência do RNA (Blencowe, 2006).

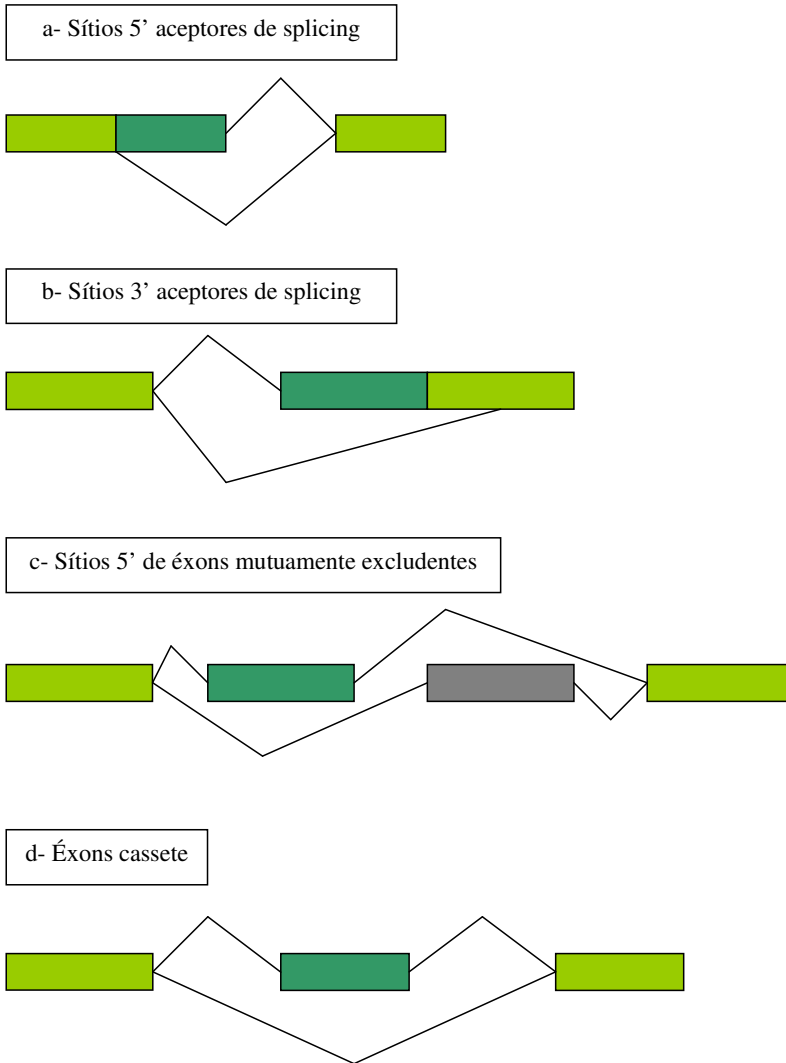


Figura 13 – Uma forma comum de *splicing* alternativo é a presença de sítios 5' (mostrado em a) ou 3' (mostrado em b) que levam à inclusão ou não de um *éxon*. Alternativamente, *éxons* mutuamente excludentes podem permutar de lugar na forma madura no mRNA (mostrado em c). *Éxons* internos (chamados de cassete) podem ser incluídos ou não na sequência final do mRNA independente dos demais *éxons* (mostrado em d). Fonte: Lee e Black, 2007, adaptado.

Sun *et al.*, (1993), descreveram diferentes elementos exônicos, ricos em purinas, que possuíam a capacidade de amplificar ou inibir a inclusão do *éxon* no RNA maduro. Elementos ricos em guanina nos *íntrons* foram posteriormente identificados como acentuadores da reação de *splicing* (Blencowe, 2006).

As proteínas que regulam o processamento ligam-se a sítios específicos denominados de:

- amplificadores de processamento exônico (ESE), do inglês, *exonic splicing enhancer*.
- amplificadores de processamento intrônico (ISE), do inglês, *intronic splicing enhancer*.
- silenciadores de processamento exônico (ESS), do inglês, *exonic splicing silencer*.
- silenciadores de processamento intrônico (ISS), do inglês, *intronic splicing silencer*.

Os primeiros sítios acentuam e os segundos reprimem a remoção dos *íntrons*. Os amplificadores e as proteínas da família SR (ricas em serina e arginina, S e R, respectivamente) são importantes no direcionamento da maquinaria de processamento para muitos *éxons*. A presença ou atividade de determinada proteína SR pode determinar a utilização de um dado sítio de processamento em um tipo celular específico ou em uma determinada fase do desenvolvimento. As proteínas SR ligam-se ao RNA através de um domínio denominado de motivo de reconhecimento do RNA (RRM, *RNA-recognition motif*) bem caracterizado. Cada proteína SR tem outro domínio rico em arginina e serina, chamado domínio RS que promove as interações entre a proteína SR e as proteínas da maquinaria de processamento do *splicing* (Watson *et al.*, 2006).

A ação de fatores *trans* (proteínas da família SR e os hnRNPs) na regulação do *splicing* depende da posição dos elementos *cis* (ESEs e ESSs) a ele ligado. Estes elementos (em *cis* e em *trans*) agem juntos durante um evento de *splicing*. A ação em conjunto destes elementos e também do spliceossomo determinam o produto final deste processamento co-transcricional (figura 12) (Black, 2003).

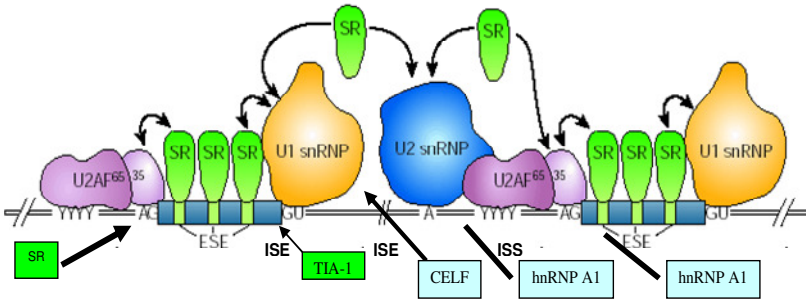


Figura 14 – Reconhecimento de éxons no processo de *splicing*. Os sítios aceptores de *splicing* **GU** e **AG** são reconhecidos pela maquinaria de *splicing* com base na sua proximidade com os éxons. Os éxons contêm sequências chamadas ativadores exônicos de *splicing* (ESE), que são sítios de ligação para as proteínas SR. Quando elas se ligam a estes sítios no RNA, recrutam as snRNP U1 para o sítio aceptor de *splicing* 5', localizado mais abaixo do SR, e recrutam o fator de *splicing* U2AF. Assim, as proteínas SR recrutam fatores de *splicing* para formar um complexo de reconhecimento. As proteínas SR também facilitam as interações entre a snRNP U1, ligada ao **GU**, e a snRNP U2, ligada à sequência de ramificação. Modificado de Maniatis e Bosiljka, 2002.

2.12. Produtos do Splicing Alternativo

Os diversos transcritos formados a partir de um único gene irão ter repercussão funcional. Mutações novas em sítios de *splicing* são responsáveis por muitas doenças humanas. Aproximadamente 15% das mutações podem levar a doenças genéticas humanas (Krawczak *et al.*, 1992), através da geração de *splicing* espúrio ou bloqueando a clivagem de *introns*. Entretanto, as alterações que ocorrem por sinais específicos tornam o *splicing* um processo desejável de formação de diversidade funcional.

O papel na regulação da expressão gênica é reforçada pelas junções exercidas pelos diversos mRNA que podem ser traduzidos formando isoformas proteicas com funções e distribuições celulares distintas como evidenciado em processos conservados em *splicing* de eucariontes. Dados sugerem que 25% dos mRNA formados por *splicing* alternativo resultam em isoformas proteicas com ganho funcional (Sorek *et al.*, 2004).

As isoformas de RNA formados por *splicing* alternativo podem conter códons de parada de tradução prematuros que atuam na degradação de mRNA na célula (Lareau *et al.*, 2004; Matlin *et al.*, 2005). A diversidade funcional gerada pelo *splicing* alternativo é evidenciada em eventos específicos como o desenvolvimento embrionário, e nos diferentes tipos e atividades das células e dos tecidos do organismo. O *splicing* alternativo é um processo frequente em tecidos especializados como do cérebro, do fígado e das gônadas.

O *splicing* em neurônios é relacionado como o principal fator responsável pelo desenvolvimento de atividades complexas do cérebro atuando na diferenciação neuroglial, na sinaptogênese e no funcionamento dos neurotransmissores e formando isoformas para os receptores do SNC (Lipscombe, 2005).

Um exemplo que demonstra a importância do *splicing* alternativo no SNC são os canais de transporte de cálcio em neurônios. O *splicing* regulado ocorre pela inclusão diferencial de éxons-cassete (Figura 11) em diversos transcritos para estes canais, que apresentam uma taxa de inclusão gradual durante o desenvolvimento até a idade adulta. A inclusão de um dos *éxons* altera domínios responsáveis pelas propriedades físico-químicas do canal resultante, gerando uma isoforma que é inativada apenas por voltagem e outra inativada apenas por neurotransmissores, em resposta a um sinal externo (Gray *et al.*, 2007).

2.13. *Splicing* Alternativo da SXF

Um dos genes expressos no SNC e que apresenta isoformas ou variantes geradas a partir de *splicing* alternativo é o gene FMR1, clonado em 1991 (Verkek *et al.*, 1991; Fu *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991).

A expressão do mRNA do FMR1 foi analisada em tecidos de encéfalo, medula espinhal e fígado de fetos humanos. Nos fetos da oitava, nona e trigésima semanas apresentavam distribuição homogênea do mRNA do FMR1. Em fetos de 25 semanas a expressão de FMR1 mostrou-se elevada no SNC (Abitbol *et al.*, 1993).

Verkek *et al.*, (1993), detectaram, por RT-PCR, 12 isoformas da proteína FMRP em vários tecidos de ratos e humanos e relataram a distribuição desigual de cada tipo. Ashley *et al.*, (1993), encontraram 12 isoformas em cérebros de ratos e humanos. Destas 12 isoformas, seis mostraram o “*spliced out*” (retirada) do éxon 14, resultando num novo terminal carboxílico. Estes estudos apenas têm descoberto partes das regiões de *splicing* alternativo do gene FMR1. A combinação destas

regiões ainda não tem sido bem investigada. O *splicing* alternativo do gene FMR1 pode contribuir para a diversidade funcional da proteína FMRP.

Huang *et al.*, (1996), estudando neurônios de fetos humanos encontraram 11 isoformas da FMRP. As isoformas não foram encontradas de maneira uniforme nos diferentes tecidos do corpo humano. A isoforma predominante apresenta *splicing* alternativo no *éxon* 17, retirando parte do mesmo e representando cerca de 40% das amostras. O transcrito primário sofre *splicing* alternativo em quatro dos dezessete *éxons* do gene FMR1.

Os pesquisadores acham que a partir do *splicing* alternativo do gene FMR1 podem ser gerados até 24 transcritos maduros diferentes e que estariam relacionados com 20 isoformas diferentes da FMRP. As isoformas provavelmente apresentam especificidade de reconhecimento para diferentes RNAs com capacidade de acoplamento da FMRP sendo responsáveis pelos diversos fenótipos da SXF (Sittler *et al.*, 1996).

Diferentes isoformas da expressão do gene FMR1 coexistem em tecidos semelhantes. O *splicing* alternativo não aparece em tecidos específicos, mas a abundância dos diversos transcritos pode ser visualizada em diferentes tecidos (Verkeij *et al.*, 1993, Verkek *et al.*, 1993; Ashley *et al.*, 1993a).

Dos 17 *éxons* do gene FMR1, os envolvidos em eventos de *splicing* alternativo concentram-se na porção 3' do gene e possuem os sítios de *splicing* com sequências mais distantes dos consensos (Eichler *et al.*, 1993). Os *éxons* 12 e 14 são do tipo cassete e os *éxons* 15 e 17 possuem três e dois sítios receptores de *splicing*, respectivamente, como representado na Figura 15.

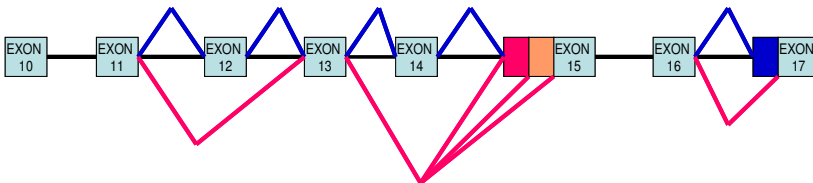


Figura 15 – Representação da região terminal 3' do gene FMR1 a partir do *éxon* 10. Os *éxons* estão representados em retângulos e os *íntrons* linha que une os retângulos. As linhas superiores e inferiores representam os padrões de *splicing*. Os *éxons* 12 e 14 são *éxons* do tipo cassete. Os *éxons* 15 e 17 têm sítios doadores de *splicing* alternativos e podem ter a inclusão de segmentados representados em vermelho e laranja para o *éxon* 15 e em azul escuro para o *éxon* 17. Fonte: A autora.

A sequência do *éxon* 12 do FMR1 está ausente nos genes parálogos FXR1 e FXR2. A exclusão do *éxon* 12 do gene FMR1 não muda a leitura da tradução. Sua inclusão acrescenta 21 resíduos de aminoácidos cuja função é desconhecida (Zhang *et al.*, 1995).

A exclusão do *éxon* 14 dos transcritos do FMR1 muda o quadro de leitura da tradução e cria possibilidade de que estas mensagens sejam degradadas. O *éxon* 14 codifica para o único sinal de exportação nuclear da FMR1 (Sittler *et al.*, 1996). O encurtamento do *éxon* 15 do FMR1 pelo uso de sítios receptores de *splicing* alternativos faz com que isoformas da FMRP sintetizadas a partir desse mRNA apresentem alteração de metilação e do controle de interação com proteínas (Dolzhanskaya *et al.*, 2006).

A escolha da análise do *splicing* alternativo nos *éxons* 15 e 17 para a realização deste trabalho é pela possibilidade de ocorrer nesta região à formação de seis possíveis isoformas do gene FMR1 e apresentar a isoforma mais comum que ocorre no *éxon* 17 (Huang *et al.*, 1996).

A seguir (Figura 16) a sequência genômica dos *éxons* 15, 16 e 17. O *éxon* 15 apresenta duas regiões de *splicing* alternativo. A primeira região está identificada com grafia em itálico e a segunda região está identificada por estar sublinhada, respectivamente. O *éxon* 17 apresenta uma região de *splicing* alternativo representado em negrito.

15-ÉXON:

*GAAC*TAATTCTGAAGCATCAAATGCTTCTGAAACAGAAATCTGACCACAGAGACGAACT
CAGTGATTGGTCATTAGCTCCAACAGAGGAAGAGAGGGAGAGCTTCTGCGCAGAG
 GAGACGGACGGCGGCGTGGAGGGGAGGAAGAGGACAAGGAGGAAGAGGACGTG
 GAGGAGGCTTCAAAG

16-ÉXON:

GAAACGACGATCACTCCCGAACAGATAATCGTCCACGTAATCCAAGAGAGGCTAAAG
 GAAGAACAACAGATGGATCCCTTCAG

17-ÉXON:

ATCAGAGTTGACTGCAATAATGAAAGGAGTGTCCACACTAAAACATTACAGAAATAC
CTCCAGTGAAGGTAGTCGGCTGCGCACGGGTAAAGATCGTAACAGAAAGAAAGAGA
AGCCAGACAGCGTGGATGGTCAGCAACCACTCGTGAATGGAGTACCCTAA

Figura 16 – Sequência genômica dos *éxons* 15, 16 e 17. O *éxon* 15 apresenta duas regiões de *splicing* alternativo destacados por grafia em itálico e sublinhado, respectivamente. O *éxon* 17 apresenta uma região de *splicing* alternativo destacado em negrito.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Grupo Amostral

Os indivíduos do presente estudo foram reunidos através de colaboração com o Laboratório Neurogene de propriedade privada (Florianópolis, SC). Foram formados três grupos de jovens do sexo masculino, sendo: quatro indivíduos com genótipos e fenótipos normais para a SXF, oito indivíduos com número de repetições CGG correspondentes à classificação *zona gray* para a SXF (com manifestações clínicas) e dois pacientes com mutação completa para a SXF. A escolha do sexo masculino foi devido à presença de um único cromossomo sexual X nos indivíduos do sexo masculino, para se reduzir os custos de pesquisa. Os testes para identificação do número de repetições CGG foram realizados no Laboratório Neurogene. Todos os sujeitos foram esclarecidos sobre a pesquisa, e livremente consentiram com a publicação de seus dados (Ver Tabelas 4 e 5, e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no Anexo 1).

Tabela 4 – Número de repetições CGG de cada indivíduo e sua respectiva classificação fenotípica.

| <i>CÓDIGO</i> | <i>NÚMERO DE REPETIÇÕES CGG</i> | <i>CARACTERÍSTICA FENOTÍPICA</i> |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 01 | | |
| 02 | | |
| 03 | 29 CGG | NORMAL |
| 04 | | |
| 05 | 41 CGG | |
| 06 | 43 CGG | |
| 07 | 41 CGG | |
| 08 | 41 CGG | |
| 09 | 44 CGG | ZONA GRAY |
| 10 | 45 CGG | |
| 11 | 47 CGG | |
| 12 | 46 CGG | |
| 13 | | |
| 14 | + de 200 CGG | AFETADO |

Tabela 5 – Descrição das características clínicas dos indivíduos zona *gray* estudados de acordo com o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo1).

| CÓDIGO | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS |
|---------------|---|
| 05 | Transtorno de déficit de atenção |
| 06 | Dificuldade de aprendizagem em matemática |
| 07 | Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor |
| 08 | Transtorno de déficit de atenção e retardo mental |
| 09 | Distúrbio de conduta e difícil sociabilidade |
| 10 | Hiperatividade, dificuldade na escrita, falta de contato visual e isolamento social |
| 11 | Dificuldade de aprendizagem em matemática |
| 12 | Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor |

3.2. Coleta de material e extração de RNA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC, Projeto nº 330/07. As extrações de RNA dos pacientes foram feitas no Laboratório Neurogene a partir de sangue periférico, utilizando-se *kit Promega*.

O sangue foi coletado com luvas estéreis, utilizando uma seringa descartável. De cada paciente foram extraídos 5 ml de sangue periférico. O sangue foi transferido para um tubo contendo EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) (6%) com anticoagulante. Em seguida foi feita a extração do RNA.

3.3. Extração de RNA a Partir de Sangue Periférico

A extração de RNA foi feita em triplicata usando o *kit Promega*, de acordo com o protocolo abaixo:

1. Adicionar 1 ml de sangue periférico em cada *tubo Eppendorf* de 200 μ L;
2. Centrifugar o sangue em 3 rpm por 5 minutos;
3. Retirar o sobrenadante;

4. Colocar 1 ml de PBS 1X;
5. Centrifugar em 7 rpm por 5 minutos;
6. Retirar o sobrenadante;
7. Acrescentar 60 μ L de solução de desnaturação;
8. Agitar em vortex;
9. Acrescentar 10 μ L de acetato sódico 2M;
10. Acrescentar 60 μ L de fenol clorofórmico;
11. Agitar o tubo por 10 segundos;
12. Deixar o tubo em freezer por 15 minutos, a -20°C ;
13. Centrifugar a 10 rpm por 20 minutos;
14. Retirar a fase aquosa que contém RNA e transferir para um novo tubo *Eppendorf*;
15. Adicionar isopropanol;
16. Deixar no freezer por 20 minutos;
17. Centrifugar em 10 rpm por 10 minutos;
18. Retirar o sobrenadante permanecendo no tubo o pellet;
19. Acrescentar 1 ml de etanol 75%;
20. Quebrar o pellet e homogeneizar com a ponteira da pipeta;
21. Centrifugar a 10 rpm por 10 minutos;
22. Eliminar o sobrenadante;
23. Deixar o pellet secar por 2 minutos;
24. Acrescentar água livre de nuclease;
25. Armazenar a -20°C .

3.4. Obtenção de cDNA

As reações de cDNA foram realizadas em tubo de microcentrifugação tipo *Eppendorf* de 200 μ L, num volume final de 20 μ L, e foram padronizadas quanto à temperatura de anelamento, número de ciclos e concentração de iniciadores. O programa da reação de cDNA consta de: desnaturação inicial a 95°C por 8 minutos, seguida por 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 66°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 8 minutos. Cada reação de cDNA contém 3,0 μ L de tampão 10X fornecido pelo fabricante da enzima; 4,0 μ L de dNTPs; 2,0 μ L de *random hexamers*; 2,0 μ L de MgCl_2 ; 3,0 μ L H_2O ; 1,0 μ L de *Improm*; 5,0 μ L de RNA. Esta solução foi submetida a ciclos de temperatura, em termociclador (MiniCycler MJ Research, Watertown, MA, USA).

3.5. Amplificação por RT-PCR

O segmento da região contendo os *éxons* 15 e 17 do gene FMR1, que contém as regiões de *splicing* alternativo, foi amplificado por PCR usando o iniciador mostrado na figura 17.

As reações de PCR foram realizadas em tubo de microcentrifugação tipo *Eppendorf* de 200 μ L, num volume final de 20 μ L.

Iniciadores ou Primers (5'-3'):

(Forward): 5' GCG GTC CTG GAT ATA CTT CA 3'
 (Reverse): 5' AGC CGA CTA CCT TCA CTG GA 3'

Figura 17 – Iniciadores utilizados na RT-PCR. Os iniciadores foram desenhados usando o programa *VECTOR NTI ADVANCE* da empresa *Invitrogen*. O iniciador forward (sentido 5'-3') 5' GCG GTC CTG GAT ATA CTT CA 3' e o iniciador reverse (sentido 3'-5') 5' AGC CGA CTA CCT TCA CTG GA 3'.

3.6. Desenhando os Iniciadores ou Primers

O desenho do iniciador começa com a busca da sequência do gene FMR1 no *site* do NCBI.

Escolhida a sequência o programa projeta os iniciadores mais adequados à reação de PCR. A análise das características dos iniciadores encontrados permite apresentar uma relação ordenada pela qualidade dos mesmos. Os iniciadores selecionados são testados quanto a sua especificidade, onde o programa realiza automaticamente alinhamento par-a-par com outras sequências em banco de dados públicos. As regiões para fazer iniciadores são pontuadas e mostradas em ordem decrescente de pontuação, para que se possam escolher as melhores regiões para se projetar os iniciadores. O programa já deixa definido quais as melhores e as piores regiões. Após terem sido definidas as regiões para os iniciadores, o programa gera os iniciadores e mostra as características de cada um. As características desejáveis em um iniciador são:

```

ATGGAGGAGCTGGTGGTGGAAAGTGCGGGGCTCCAATGGCGCTTCTACAAGGCATTGTGAAA
GGATGTTTCATGAAGATTCAATAACAGTTGCATTTGAAAAACAATGGCAGCCTGTATAGG
CAGATTTCCATTTTCATGATGTCAGATTTCCACCTCCTGTAGGTTATAATAAAGATATAAATGAA
AGTGATGAAGTTGAGGTGTATTCCAGAGCAAATGAAAAAGAGCCTTGCTGTTGGTGG
TTAGCTAAAGTGAGGATGATAAAGGGTGAGTTTTATGTGATAGAATATGCAGCATGTGATGCA
ACTTACAATTGAAATTTGTCACAATTGAACGTCTAAGATCTGTTAATCCCAACAAACCT
GCCACAAAAGATACTTTCCATAAAGATCAAGCTGGATGTGCCAGAAGACTTACGGCAAATGTG
TGCCAAAGAGGGCGGCACATAAGGATTTTAAAAAGGCAGTTGGTGCCTTTTCTGTAACCT
TATGATCCAGAAAATTATCAGCTTGTCAATTTTGCCATCAATGAAGTCACCTCAAAGCGAGCA
CATATGCTGATTGACATGCACCTTTCGGAGTCTGCGCACTAAGTTGTCTCTGATAATG
AGAAATGAAGAAAGCTAGTAAGCAGCTGGAGAGTTCAAGGCAGCTTGCCTCGAGATTTTCATGA
ACAGTTTATCGTAAGAGAAAGATCTGATGGGTCTAGCTATTGGTACTCATGGTGCTAAT
ATTCAGCAAGCTAGAAAAGTACCTGGGGTCACTGCTATTGATCTAGATGAAGATACCTGCACA
TTTCATATTTATGGAGAGGATCAGGATGCAGTGAAAAAGCTAGAAAGCTTTCTCGAA
TTTGTCTGAAGATGTAATACAAGTTCCAAGGAACTTAGTAGGCAAAAGTAATAGGAAAAAATGG
AAAGCTGATTCCAGAGATTGTGGACAAGTCAAGGAGTTGTGAGGGTGAGGATTGAGGCT
GAAAAATGAGAAAAATGTTCCACAAGAAGAGGAAATATGCCACCAAATCCCTTCCCTTCCAAT
AATTCAGGGTTGGACCTAATGGCCCCAGAAGAAAAAAACATTTAGATATAAAGGAA
AACAGCACCCATTTTCTCAACCTAACAGTACAAAAGTCCAGAGGGTGTAGTGGCTTCATCA
GTTGTAGCAGGGGAATCCAGAAACCTGAECTCAAGGCTTGGCAGGGTATGGTACCA
TTTTTTTTGTGGGAACAAAGGACAGCATCGCTAATGCCACTGTTCTTTGGATTATCACCTGA
ACTATTTAAAGGAAGTAGACCAGTTGCGTTTGGAGAGATTACAAATGTATGAGCAG
TTGCGACAGATTGGAGCTAGTTCTAGACCACCACCAAATCGTACAGATAAGGAAAAAGCTA
TGTGACTGATGATGGTCAAGGAATGGGTTCGAGGTAGTAGACCTTACAGAAATAGGGGG
CACGGCAGACGCGGTCTGGATATACTTCAGGAACTAATCTGAAAGCATCAAATGCTTCTGAA
ACAGAATCTGACCACAGAGACGAACTCAGTGATTGGTCATTAGCTCCAACAGAGGAA
GAGAGGGAGAGCTTCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGGTGGAGGGGGAGGAAAGAGGAC
AAGGAGGAAGAGGACGTGGAGGAGGCTTCAAAGGAAACGACGATCACTCCGAACAGAT
AATCGTCCACGTAATCCAAGAGAGGCTAAAGGAAGAACAACAGATGGATCCCTTCAGATCAG
AGTTGACTGCAATAATGAAAGGAGTGTCCACACTAAAAACATTACAGAATACCTCCAGT
GAAGGTAGTCGGTCTGCGCACGGTAAAGATCGTAACCAGAAGAAAGAGAAGCCAGACAGCG
TGGATGGTCAAGCAACCACTCGTAATGGAGTACCCTAA

```

Figura 18 – Sequência do gene *Homo sapiens* fragile X mental retardation 1 (FMR1), mRNA.

- temperatura de *melting* (T_m) na faixa de 52 °C a 65 °C. A temperatura de *melting* é a temperatura na qual metade das fitas de DNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice,
- ausência da capacidade de dimerização e
- ausência significativa da formação de grampos (>3 bp), inexistência de sítios secundários de anelamento dos iniciadores, baixa especificidade na ligação na extremidade 3' (menor conteúdo de GC).

Os iniciadores desenhados nesta pesquisa têm 20 pares de bases, quanto maior o comprimento do iniciador, maior a possibilidade deste ser exclusivo. A composição de bases afeta a especificidade da hibridização, as temperaturas de *melting* e anelamento e a estabilidade

interna. A quantidade de (G+C ou guanina + citosina) deve estar em torno de 50-60% para assegurar as temperaturas de *melting* e anelamento adequadas à reação de PCR, e, desta forma, fornecer estabilidade na hibridização. As temperaturas de *melting* e anelamento e a estabilidade na hibridização são também afetadas por outros fatores. O aumento do conteúdo de G+C no DNA gera um aumento na T_m ocasionado pelo maior número de ligações de pontes de hidrogênio. A temperatura de anelamento é a temperatura na qual os iniciadores se pareiam ao DNA molde. Ela pode ser calculada a partir da T_m . Para assegurar que o pareamento dos iniciadores ao DNA molde ocorra antes que as duas fitas se liguem uma à outra, é necessário que a T_m seja $\geq 30^\circ\text{C}$. Se os iniciadores puderem parear com eles mesmos, ou parearem um com o outro mais facilmente do que com o DNA molde, então a eficiência do PCR irá ser reduzida. Iniciadores com estas características devem ser evitados. Alguns dímeros (anelamento de dois iniciadores) ou grampos (anelamento do iniciador com ele mesmo, quando dobrado) são formados a 30°C , enquanto que durante o ciclo do PCR a temperatura mais baixa seja de 60°C . Os iniciadores deste trabalho são formados em pares – *forward primer* e *reverse primer* e foi preciso que as condições do PCR estejam adequadas ao funcionamento de ambos. Um ponto crítico são suas temperaturas de anelamento, as quais deverão ser compatíveis entre si. A máxima diferença que pode ser observada entre elas é de 3°C . Os iniciadores desenhados apresentam:

FORWARD PRIMER

GCG GTC CTG GAT ATA CTT CA

Similaridade: 100.0%

Comprimento: 20 pares de bases

T_m : 49.2°C

GC: 50.0

REVERSE PRIMER

AGC CGA CTA CCT TCA CTG GA

Similaridade: 100.0%

Comprimento: 20 pares de bases

T_m : 51.3°C

GC: 55.0

3.7. Reação de RT-PCR:

O programa da reação de RT-PCR consta de: desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, seguida por 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Cada reação de PCR contém 5,0 µL de cDNA, 2,0 µL tampão 10X fornecido pelo fabricante da enzima, 3,0 µL dNTPs, 6,0 µL de H₂O, 0,4 µL de Taq DNA Polimerase, 0,6 de MgCl₂ e 4,0 µL de cada iniciador. Esta solução foi submetida a ciclos de temperatura, em termociclador (*MiniCycler MJ Research, Watertown, MA, USA*).

3.8. Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% com 3 µL de brometo de etídio, que revelará o DNA quando exposto à radiação UV a seguinte mistura: 15 µL do produto de PCR, juntamente com 2 µL de tampão de corrida (azul de bromefenol 0,03%, xileno cianol 0,03% e laranja G 0,4%). O gel foi previamente preparado pela diluição de 2 g de agarose (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) em TAE (tris, ácido acético e EDTA) 1X q.s.p. 100 ml, seguida de aquecimento a 60°C. A solução foi vertida em aparato horizontal para eletroforese (Horizon 11.14, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA) e foi permitida a polimerização à temperatura ambiente por 20 minutos. A eletroforese ocorreu a 130 V por aproximadamente 60 minutos em tampão TAE 1X e o resultado, produto da PCR, pode ser visualizado através de transluminador ultravioleta (UVP, Upland, CA, USA). No gel também é acrescido um marcador de peso molecular de 50 pares de bases para posterior comparação do tamanho do fragmento analisado.

3.9. Visualização do Produto de RT-PCR

Após o procedimento de eletroforese, para determinar o tamanho do fragmento esperado, foram observadas as regiões no *éxon* 15 (A e B) e *éxon* 17 (C) que contém *splicing* alternativo segundo Verkerk *et al.*, (1993) (Figura 19). É feita à subtração de cada segmento resultando em seis possibilidades conforme Tabela 6. O tamanho dos fragmentos obtidos, chamados de bandas, foi determinado utilizando como referência o marcador de peso molecular de 50 pares de bases (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*).

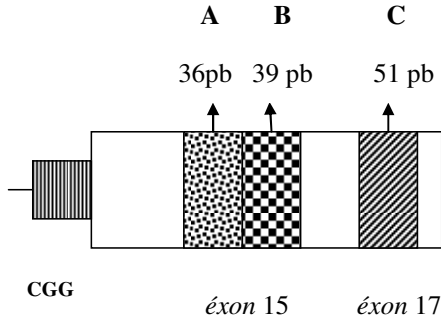


Figura 19 – Regiões de *splicing* nos *éxons* 15 e 17 do gene FMR1, segundo Verkerk, 1993.

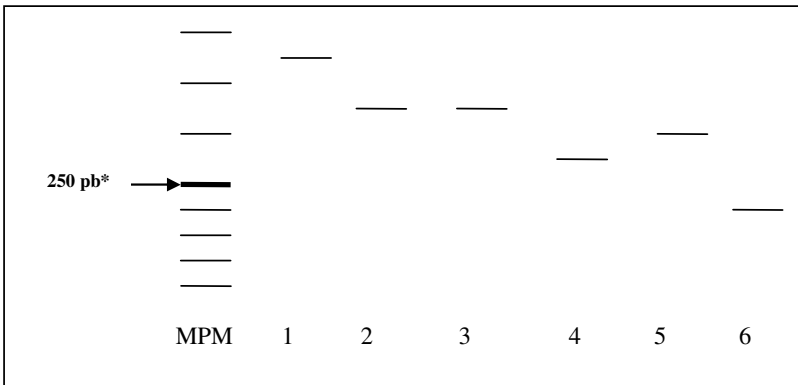


Figura 20 – Visualização dos produtos de RT-PCR dos *éxons* 15 e 17 do gene FMR1. Resultado do tamanho do fragmento sem ocorrência de *splicing*, na fileira 1. Resultado do tamanho do fragmento com *splicing* no *éxon* 15, retirada de 36 pb, na fileira 2. Resultado do tamanho do fragmento com *splicing* no *éxon* 15, retirada de 39 pb, na fileira 3. Resultado do tamanho do fragmento com *splicing* total no *éxon* 15 retirada de 75 pb, na fileira 4. Resultado do tamanho do fragmento com *splicing* do *éxon* 17 com a retirada de 51 pb, na fileira 5. Resultado do tamanho do fragmento com *splicing* total do *éxon* 15 e *éxon* 17 com a retirada 126 pb, na fileira 6. “MPM” se refere a marcador de peso molecular de 250 pb.

Tabela 6 – Tamanho dos fragmentos esperados nas reações de *splicing* no experimento, usando os iniciadores (F): 5' GCG GTC CTG GAT ATA CTT CA 3' e (R): 5' AGC CGA CTA CCT TCA CTG GA 3'.

| Regiões de <i>splicing</i> | Tamanho do fragmento/pb |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Sem <i>splicing</i> | 364 |
| <i>Splicing no éxon 15</i> | 328 |
| <i>Splicing no éxon 15</i> | 325 |
| <i>Splicing no éxon 15</i> | 289 |
| <i>Splicing no éxon 17</i> | 313 |
| <i>Splicing no éxon 15 e 17</i> | 238 |

4. RESULTADOS

Usando os iniciadores (F): 5' GCG GTC CTG GAT ATA CTT CA 3' e (R): 5' AGC CGA CTA CCT TCA CTG GA 3', que formam fragmentos esperados com tamanhos de: 364 pb, 328 pb, 325 pb, 289 pb, 313 pb e 238 pb conforme presença ou ausência das regiões de *splicing* alternativo nos *exons* 15 e 17 do gene FMR1.

4.1 Interpretação e Visualização dos Produtos da Amplificação RT-PCR em Géis de Agarose:

A Figura 21 (a) mostra os resultados obtidos em indivíduos normais indicados pelos códigos: 02, 03 e 04 e em indivíduos afetados pela SXF indicados pelos códigos: 13 e 14. A Figura 21 (b) mostra o resultado obtido para o indivíduo normal 01. O tamanho dos fragmentos esperados é de 364 pb (se não ocorrer *splicing* alternativo), 328 pb (se ocorrer *splicing* alternativo no *éxon* 15 com a retirada da sequência contendo 36 pb), 325 pb (se ocorrer *splicing* alternativo no *éxon* 15 com a retirada da sequência contendo 39 pb), 289 pb (se ocorrer *splicing* no *éxon* 15 com a retirada das sequências com 36 pb e 39 pb num total de 75 pb), 313 pb (se ocorrer *splicing* alternativo no *éxon* 17 com a retirada da sequência com 51 pb) e 238 pb (se ocorrer *splicing* alternativo no *éxon* 15 e *éxon* 17 com a retirada das sequências com 36 pb, 39 pb e 51 pb num total de 126 pb).

A Figura 21 (a) mostra que o indivíduo 02 apresentou duas bandas com fragmentos de tamanho de 289 pb e 310 pb. O fragmento com 310 pb corresponde ao fragmento de 313 pb que corresponde a região de *splicing* alternativo no *éxon* 17 com a retirada da sequência com 51 pb. O indivíduo 03 apresentou duas bandas com fragmentos de tamanho 238 pb e 289 pb. O indivíduo 04 apresentou uma banda com tamanho do fragmento de 289 pb.

Pode ser mostrado pela Figura 21 (b) que no indivíduo 01 foram visualizadas quatro bandas com fragmentos de tamanho de 238 pb, 260 pb, 310 pb e 364 pb.

Os indivíduos afetados, 13 e 14, não formaram bandas, conforme mostrado na Figura 21 (a).

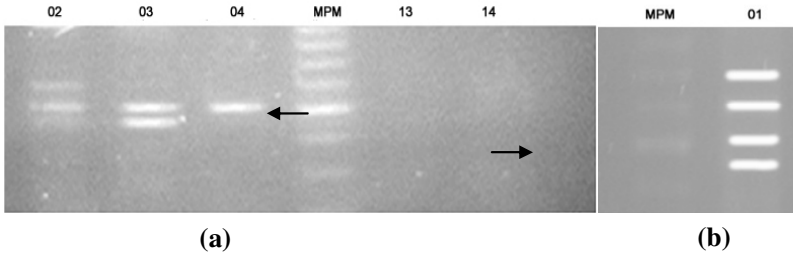
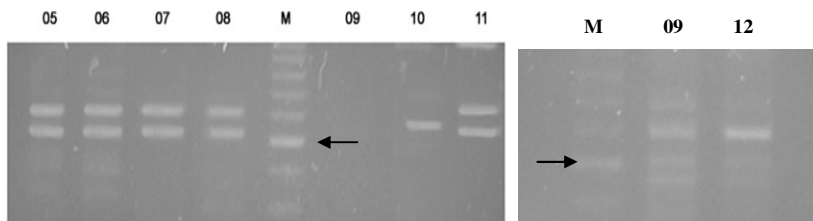


Figura 21 – Visualização dos fragmentos amplificados por RT- PCR em gel de agarose. Alelos de indivíduos normais do sexo masculino indicados pelos códigos: 01, 02, 03, 04 e dos indivíduos afetados pela SXF indicados pelos códigos: 13 e 14. “MPM” se refere a marcador de peso molecular de 250 pb (indicado pela seta) e “pb” a pares de bases.

As Figuras 22 (a e b) mostram os indivíduos zona *gray* indicados pelos códigos 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 e 12. O indivíduo 05 apresentou duas bandas com tamanho do fragmento de aproximadamente 289 pb e 310 pb. O indivíduo 06 apresentou duas bandas com tamanho do fragmento de aproximadamente 289 pb e 310 pb. O indivíduo 07 apresentou duas bandas com tamanho do fragmento de aproximadamente 289 pb e 310 pb. O indivíduo 08 apresentou duas bandas com tamanho do fragmento de aproximadamente 289 pb e 310 pb. O indivíduo 09 apresentou quatro bandas com tamanho do fragmento de aproximadamente 238pb, 250pb, 310 pb e 350 pb. O indivíduo 10 apresentou uma banda com tamanho do fragmento de aproximadamente 289 pb. O indivíduo 11 apresentou duas bandas com tamanho do fragmento de aproximadamente 284 pb e 330 pb. O indivíduo 12 apresentou uma banda com tamanho do fragmento de aproximadamente 300 pb.



(a)

(b)

Figura 22 – Visualização dos fragmentos amplificados por RT- PCR em gel de agarose. Alelos de indivíduos zona *gray* do sexo masculino indicados pelos códigos: 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 e 12. “M” se refere a marcador de peso molecular de 250 pb (indicado pela seta) e “pb” a pares de bases.

5. DISCUSSÃO

O *splicing* alternativo é um importante gerador de diversidade funcional no sistema nervoso central onde participa da geração de variantes para mais de 80% dos genes. O gene FMR1 pode sofrer *splicing* alternativo de quatro *éxons*, produzindo até vinte isoformas diferentes da FMRP. As variantes de mRNA podem ser traduzidas dando origem a isoforma proteicas com funções ou distribuições distintas, evidenciado pela conservação de eventos de *splicing* em eucariontes. As semelhanças entre as sequências, principalmente em mamíferos indicam que pelo menos 25% das variantes geradas por *splicing* alternativo resultem em isoformas com ganho funcional (Sorek *et al.*, 2004).

A transcrição do gene FMR1 foi estudada através da extração do mRNA total proveniente de sangue periférico de 14 indivíduos jovens do sexo masculino. O produto de RT-PCR foi obtido com a utilização de dois iniciadores que tem a função de “cortar” o segmento a partir do *éxon* 15 até o *éxon* 17, onde estão localizadas três regiões de *splicing* alternativo (Verkek *et al.*, 1993).

O indivíduo 03 apresentou *splicing* alternativo nos *éxons* 15 e 17 com a remoção das regiões A, B e C (Figura 19) originando um fragmento com 238 pb.

Os indivíduos 02, 03 e 04, apresentaram *splicing* alternativo no *éxon* 15 com a remoção da região A e B (Figura 19) originando um fragmento com 289 pb.

Os indivíduos 01 e 02 apresentaram *splicing* alternativo no *éxon* 17 com a remoção da região C (Figura 19) originando um fragmento com 310 pb que corresponde ao fragmento com 313 pb.

O indivíduo 01 não apresentou *splicing* alternativo formando um fragmento com 364 pb.

Os indivíduos zona *gray* 05, 06, 07, 08 e 10 apresentaram *splicing* alternativo no *éxon* 15 com a remoção da região A e B (Figura 19) originando um fragmento com 289 pb.

Os indivíduos zona *gray* 05, 06, 07 e 08 apresentaram *splicing* alternativo no *éxon* 17 com a remoção da região C (Figura 19) formando um fragmento com tamanho aproximado de 310 pb.

O indivíduo 09 apresentou *splicing* alternativo nos *éxons* 15 e 17 com a remoção das regiões A, B e C (Figura 19) originando um fragmento com 238 pb.

O indivíduo 11 apresentou uma banda com aproximadamente 284 pb que representa o *splicing* alternativo no *éxon* 15 com a remoção da região A e B (Figura 19).

O indivíduo 09 apresentou três bandas (250 pb, 300 pb e 350 pb) que não correspondem a regiões de *splicing* alternativo conforme mostrado na figura 19.

O indivíduo 11 apresentou uma banda de 330 pb que não corresponde a regiões de *splicing* alternativo conforme mostrado na figura 19.

O indivíduo 12 apresentou uma banda de 300 pb que não corresponde a regiões de *splicing* alternativo conforme mostrado na figura 19.

Os indivíduos afetados pela SXF, 13 e 14, não formaram bandas conforme esperado, já que nestes indivíduos o gene FMR1 está metilado.

Tabela 7 – Os indivíduos analisados nesta pesquisa em relação ao tipo de *splicing* alternativo que cada um apresentou de acordo com o tamanho do fragmento visualizado nas figuras 21 e 22 e suas respectivas características fenotípicas.

| | | Tamanho do fragmento pb | 238 | 250 | 260 | 289 | 300 | 310 | 330 | 350 | 364 |
|----------------|-----------------------------|---|--------------|-----|---------|-----|---------|-----|------------|-----|-----|
| | | Local do <i>splicing</i> alternativo | Èxon 15 e 17 | | Éxon 15 | | Éxon 17 | | Sem splice | | |
| | | Sequências retiradas/pb | 126 | | 75 | | 51 | | | | |
| Repetições CGG | Características Fenotípicas | | | | | | | | | | |
| 1 | | X | | X | | | | X | | | X |
| 2 | 29 | Indivíduo normal | | | | X | | X | | | |
| 3 | | | X | | | X | | | | | |
| 4 | | | | | | X | | | | | |
| 5 | 41 | Transtorno déficit de atenção | | | | X | | X | | | |
| 6 | 43 | Dificuldade de aprendizagem em matemática | | | | X | | X | | | |

| | | | | | | |
|----|-------|---|---|---|---|---|
| 7 | 41 | Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor | | | X | X |
| 8 | 41 | Transtorno de déficit de atenção e retardo mental | | | X | X |
| 9 | 44 | Distúrbio de conduta difícil sociabilidade | X | X | | X |
| 10 | 45 | Hiperatividade, dificuldade na escrita, falta de contato visual e isolamento social | | | X | |
| 11 | 47 | Dificuldade de aprendizagem | | | X | X |
| 12 | 46 | Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor | | | | X |
| 13 | + 200 | Indivíduo afetado | | | | |
| 14 | | | | | | |

De acordo com literatura os diferentes tipos de *splicing* alternativo estão presentes nos diversos tecidos do corpo humano. Verkek *et al.*, (1993), analisaram pâncreas, linfócitos modificados e testículos de adultos; e pâncreas, fígado, cérebro de fetos onde encontraram quatro bandas em todos os tecidos analisados.

Os resultados obtidos usando sangue periférico de indivíduos jovens do sexo masculino foram encontrados todos os tipos de *splicing* alternativo que ocorre na região entre o *éxon* 15 e o *éxon* 17 do gene FMR1, porém as amostras analisadas apresentavam geralmente dois tipos de *splicing* alternativo conforme explicitado anteriormente.

Neste estudo o *splicing* alternativo mais frequente é o que ocorre no *éxon* 15 com o *splice out* (retirada) das regiões A e B (Figura 19) resultando numa isoforma com ausência de 75 pb. No *éxon* 15 estão presentes duas estruturas de RNA de quarteto G que são equidistantes (39 pb e 36 pb, respectivamente), sendo esta sequência um ESE

(Amplificador de processamento exônico), e que poderia atuar no controle do *splicing* alternativo deste *éxon* (Didiot *et al.*, 2008).

O segundo *splicing* alternativo mais frequente neste estudo é o que retira parte do *éxon* 17 resultando numa isoforma com aproximadamente 313 pb. Verkek *et al.* (1993); Huang *et al.*, (1996), relataram em seus estudos que este é o tipo de *splicing* alternativo mais frequente em todos os tecidos por eles analisados e que o *splicing* alternativo no *éxon* 15, resultando numa isoforma com 289 pb, é o segundo evento mais frequente.

A ausência de *splicing* alternativo e a retirada das regiões A e B (Figura 19) do *éxon* 15 e da região C (Figura 19) do *éxon* 17 são eventos menos frequentes nas amostras analisadas. Estes dados são corroborados pelos estudos de Verkek *et al.*, (1993) e Huang *et al.*, (1996).

A origem das amostras usadas na extração de RNA total usando sangue periférico de indivíduos jovens do sexo masculino pode ter influenciado no resultado do tipo de *splicing* alternativo mais comumente encontrado em estudos anteriores. Nos estudos realizados por Verkek *et al.*, (1993) e Huang *et al.*, (1996), a extração de RNA foi realizada, principalmente, a partir de tecidos de fetos como: córtex cerebral e hipocampo que são estruturas mais comumente utilizadas dadas a alta expressão do gene FMR1 nestes tecidos e sua importância funcional no aprendizado (Hinds *et al.*, 1993). Pode ser que haja maior quantidade de *splicing* alternativo em tecidos fetais pela necessidade de produção de diferentes proteínas originadas a partir de um mesmo gene.

A partir dos resultados obtidos não foi possível encontrar um padrão de *splicing* alternativo nos indivíduos zona *gray*, como demonstrado neste trabalho. A frequência de ocorrência dos tipos de *splicing* alternativo segue o padrão dos indivíduos normais. É recomendável ampliar o número de testes com um número maior de indivíduos zona *gray* para corroborar os resultados obtidos neste estudo. Porém, o número de voluntários nesta faixa de classificação para SXF é muito pequeno, pois por apresentarem geralmente fenótipos “suaves” para a SXF os testes para verificar o número de repetições CGG nem sempre são realizados. Uma maior conscientização para a realização de testes nesta população que apresenta dificuldades de aprendizagem é necessário, identificando pessoas que possam apresentar o número de repetições de CGG na faixa zona *gray* e poder auxiliar no tratamento dos sintomas já que a cura para este problema ainda não foi descoberta e o aconselhamento genético para evitar a transmissão para os descendentes. O aumento do número de amostras pode melhorar os resultados de futuros estudos.

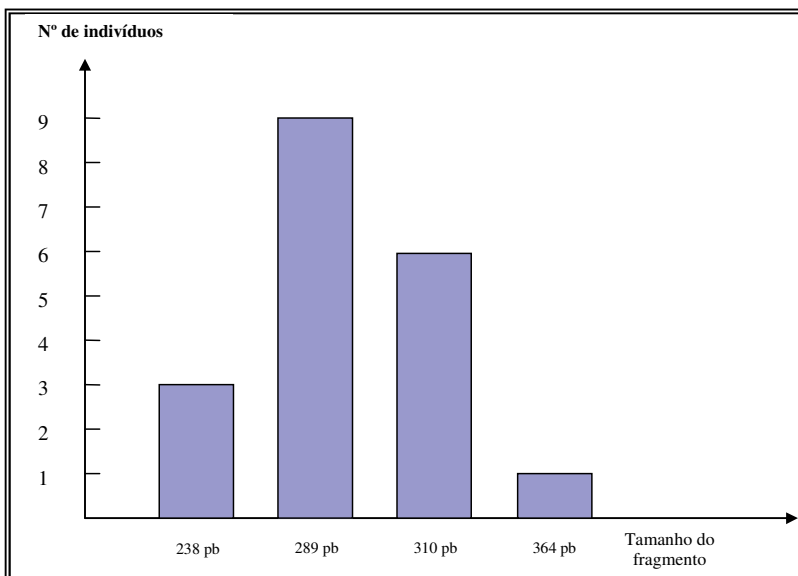


Figura 23 – Número de indivíduos encontrados em relação ao padrão de *splicing* alternativo apresentado de acordo com o tamanho do fragmento obtido através de RT-PCR e mostrado nas figuras 21 e 22.

6. CONCLUSÕES

Após a obtenção dos fragmentos através de RT-PCR foi possível concluir que:

Não há diferença no tipo de *splicing* alternativo entre os indivíduos zona gray e indivíduos normais.

O tipo de *splicing* alternativo mais frequente neste estudo, usando sangue periférico para extração de RNA total ocorre no *éxon* 15 onde há uma região que provavelmente regula a expressão da FMRP.

Os traços leves do fenótipo para a SXF que os indivíduos zona *gray* apresentam não estão relacionados com o *splicing* alternativo dos *éxons* 15 e 17 já que os resultados obtidos são muito semelhantes aos dos indivíduos normais para a SXF.

Os resultados obtidos em sangue periférico são tão pertinentes quanto os resultados provenientes de cortes histológicos de córtex, de hipocampo, de fígado, de pâncreas de adultos e fetos relatados em estudos anteriores.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar o número de testes em indivíduos zona *gray*.
- Pesquisar as regiões de *splicing* alternativo nos *éxons* 12 e 14.
- Pesquisar o *splicing* alternativo dos *éxons* 12, 14, 15 e 17 em mulheres.

8. GLOSSÁRIO

Alelo: uma de um conjunto de formas alternativas de um gene.

cDNA: molécula de DNA sintetizada como uma cópia de RNA mensageiro e, portanto, sem os *íntrons* que estão presentes no DNA genômico.

Código genético: conjunto de regras que especificam a correspondência entre os tripletos de nucleotídeos (códon) no DNA ou RNA e os aminoácidos em proteínas.

Controle pós-transcricional: qualquer controle da expressão gênica que é exercido após a transcrição do gene.

Controle traducional: controle da expressão gênica feito pela seleção de quais mRNAs no citoplasma são traduzidos pelos ribossomos.

Controle transcricional: controle da expressão gênica pelo controle de quando e quão frequentemente o gene é transcrito.

Cromossomo sexual: cromossomo que pode estar presente ou ausente, ou ainda presente em um número variável de cópias, de acordo com o sexo do indivíduo; em mamíferos, por exemplo são os cromossomos X e Y.

DNA: polinucleotídeo formado por unidades de desoxirribonucleotídeos ligadas covalentemente. Serve como armazenador da informação hereditária dentro de uma célula e como o carreador dessa informação de uma geração para outra.

DNA genômico: DNA que constitui o genoma de uma célula ou organismo.

DNA polimerase: enzima que sintetiza DNA pela união de nucleotídeos, usando um molde de DNA como guia.

Domínio protéico: porção de uma proteína com uma estrutura terciária particular. As proteínas grandes são geralmente compostas por vários

domínios, cada um conectado ao próximo através de regiões flexíveis curtas da cadeia polipeptídica.

Éxon: segmento de um gene eucariótico que consiste de uma sequência de nucleotídeos que serão representados no RNA mensageiro, ou no RNA transportador final, ou no RNA ribossomal. Em genes que codificam proteína, os *éxons* codificam os aminoácidos da proteína. Um *éxon* está geralmente adjacente a um segmento de DNA não-codificante, chamado *íntron*.

Fator de transcrição: qualquer proteína necessária para iniciar ou regular a transcrição em eucariotos. Inclui tanto as proteínas de regulação gênica como os fatores gerais de transcrição.

Gene pleiotrópico: gene que possui controle sobre as manifestações de várias características fenotípicas.

Gene parálogo: dois ou mais *locus* gênicos derivados por duplicação de um *locus* ancestral e que ocorrem em um genoma.

Genoma: informação genética total carregada por uma célula ou organismo; especificamente, o DNA, que carrega esta informação.

Heterodímero: complexo protéico composto por duas cadeias polipeptídicas diferentes.

Homodímero: complexo protéico composto por duas cadeias polipeptídicas iguais.

Ilhas CG ou CpG: região do DNA com um grande densidade média de sequências CG; essas regiões, geralmente não são metiladas.

Iniciador de RNA (primer de RNA): pequeno trecho de RNA sintetizado sobre um molde de DNA. É requerido pelas DNA polimerases para o início da síntese de DNA.

Íntron: região não-codificante de um gene eucarioto que é transcrita na molécula de RNA, mas é removida através do splicing do RNA durante a produção do RNA mensageiro ou outra estrutura de RNA funcional.

Isoforma ou variante proteica: formação de diferentes mRNAs a partir de um único gene.

Metilação do DNA: adição de um grupo metila ao DNA. A metilação extensiva da base citosina em sequência CG é usada pelos vertebrados para colocar os genes em seu estado inativo.

Motivo: elemento de estrutura ou padrão repetido em vários contextos específicos. É um pequeno domínio estrutural que pode ser reconhecido em várias proteínas.

mRNA: molécula de RNA que especifica a sequência de aminoácidos de uma proteína. Produzido por *splicing* de RNA (em eucariotos) a partir de uma molécula maior de RNA, sintetizada pela RNA polimerase como uma cópia complementar do DNA. O mRNA é traduzido em proteína em um processo catalisado pelos ribossomos.

Prevalência: número de casos clínicos ou de portadores existentes em um determinado momento, em uma comunidade, dando uma idéia estática da ocorrência do fenômeno.

Proteína hnRNP: qualquer uma de um grupo de proteínas que se associam sobre o RNA recém-sintetizado, organizando-o em uma forma mais compacta.

Região de controle gênico: sequências de DNA necessárias para o início da transcrição de um determinado gene e controle da taxa de iniciação.

RNA nuclear pequeno: moléculas de RNA pequenas que são complexadas com proteínas para formar as partículas de ribonucleoproteínas envolvidas no processamento do RNA.

RNA polimerase: enzima que catalisa a síntese de uma molécula de RNA a partir de uma fita de DNA-molde e de nucleosídeos trifosfatos precursores.

Sequência consenso: forma média ou mais característica de uma sequência, que é reproduzida com pequenas alterações em um grupo relacionado de sequências de DNA, RNA ou proteína.

Sinal de exportação nuclear: sinal de endereçamento contido na estrutura de moléculas e complexos, tais como RNA e novas subunidades ribossomais, que são transportadas do núcleo para o citosol, através de complexos de poros nucleares.

Sinal de localização nuclear: sequências ou regiões sinalizadoras encontradas em proteínas destinadas para o núcleo e que possibilitam o transporte seletivo para dentro do núcleo a partir do citosol, através de complexos de poros nucleares.

Sítio ativo: região da superfície de uma enzima na qual uma molécula de substrato deve se ligar para sofrer a reação catalítica.

Sítio de ligação: uma região na superfície de uma molécula que pode interagir com outra molécula através de uma ligação não-covalente.

Spliceossomo: grande grupo de RNA e moléculas de proteína que executam o *splicing* do pré-mRNA nas células eucarióticas.

***Splicing* alternativo de RNA:** processo pelo qual sequências de íntrons são removidas dos transcritos de RNA por excisão, no núcleo, durante a formação do RNA mensageiro e outros RNAs.

Tradução: processo no qual a sequência de nucleotídeos em uma molécula de RNA mensageiro direciona a incorporação de aminoácidos em uma proteína. Ocorre nos ribossomos.

Transcrição: reprodução de uma fita de DNA em uma sequência de RNA complementar, pela enzima RNA polimerase.

Transcrito: RNA produzido a partir da transcrição de DNA.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allingham-Hawkins, D. J., R. Babul-Hirji, 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(4): 322-5.

ALBERTS, B. et al. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science Publishing. 1400p. (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&id=mboc4.TOC&depth=2>)

Ast, G. (2004). "How did alternative splicing evolve?" Nat Rev Genet 5(10): 773-82.

Arena, J. F. and H. A. Lubs (1991). "Computerized approach to X-linked mental retardation syndromes." Am J Med Genet 38(2-3): 190-9.

Ashley, C. T., J. S. Sutcliffe, et al. (1993). "Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat." Nat Genet 4(3): 244-51.

Baba, Y. and R. J. Uitti (2005). "Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome and movements disorders." Curr Opin Neurol 18(4): 393-8.

Bardoni, B., A. Sittler, A., Shen, Y. and Mandel, J.L. (1997). "Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein." Neurobiol Dis 4(5): 329-36.

Barbato, Ingrid T. (2006). "Avaliação de Estratégia Terapêutica pela Ingestão de um Conjunto de Aminoácidos em Portadores da Síndrome do X Frágil: Estudo Clínico e Neuroquímico". Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
<http://www2.enq.ufsc.br/teses/m167.pdf>

Beilina, A., F. Tassone, Schwartz P. H., Sahota P., Hagerman P. J. (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.

Berget, S. M. and B. L. Robberson (1986). "U1, U2, and U4/U6 small nuclear ribonucleoproteins are required for in vitro splicing but not polyadenylation." Cell 46(5): 691-6.

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

Black, D. L. (2003). "Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing." Annu Rev Biochem 72: 291-336.

Blake, C. C. (1979). "Exons encode protein functional units." Nature 277(5698): 598.

Blencowe, B. J. (2006). "Alternative splicing: new insights from global analyses." Cell 126(1): 37-47.

Bodega, B., S. Bione, et al. (2006). "Influence of intermediate and uninterrupted FMR1 CGG expansions in premature ovarian failure manifestation." Hum Reprod 21(4): 952-7.

Brack, C. and S. Tonegawa (1977). "Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5652-6.

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.

Brown WT, Houck GE Jr, Jeziorowska A, Levinson FN, Ding X, Dobkin C, Zhong N, Henderson J, Brooks SS, Jenkins EC (1993). "Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test." Jama 270(13): 1569-75.

Catterall, J. F., B. W. O'Malley, et al. (1978). "Nucleotide sequence homology at 12 intron-exon junctions in the chick ovalbumin gene." Nature 275(5680): 510-3.

L. Chen, S-W. Yun, J. Seto, W. Liu and M. Toth. (2003). "The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing U rich target sequences." Neuroscience 120(4): 1005-17.

Chiurazzi, P., L. Kozak, Neri G. (1994). "Unstable triplets and their mutational mechanism: size reduction of the CGG repeat vs. germline mosaicism in the fragile X syndrome." Am J Med Genet 51(4): 517-21.

Cohen, I. L., S. L. Nolin, Sudhalter V, Ding XH, Dobkin CS, Brown WT (1996). "Mosaicism for the FMR1 gene influences adaptive skills development in fragile X-affected males." Am J Med Genet 64(2): 365-9.

Cornish, K., C. Kogan, Turk, J.; Manly, T.; James, N., Mills, A., Dalton, A. (2005). "The emerging fragile X premutation phenotype: evidence from the domain of social cognition." Brain Cogn 57(1): 53-60.

Cornish, K., V. Sudhalter, Turk J. (2004). "Attention and language in fragile X." Ment Retard Dev Disabil Res Rev 10(1): 11-6.

Crawford, D. C., Acuña JM., Sherman SL. (2001). "FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review." Genet Med 3(5): 359-71.

Crawford, D. C., Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Pettay DL, Gold LB, Hersey SJ, Hinkle EF, Stanfield ML, Holmgreen P, Yeargin-Allsopp M, Boyle C, Sherman SL. (1999). "Prevalence and phenotype consequence of FRAXA and FRAXE alleles in a large, ethnically diverse, special education-needs population." Am J Hum Genet 64(2): 495-507.

Crawford DC, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Scott E, Leslie M, Shubek L, Holmgreen P, Yeargin-Allsopp M, Boyle C, Sherman SL. (2002). "Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans." Am J Med Genet 110(3): 226-33.

Crick, F. (1979). "Split genes and RNA splicing." Science 204(4390): 264-71.

Jennifer C. Darnell, Kirk B. Jensen, Peng Jin, Victoria Brown, Stephen T. Warren and Robert B. Darnell (2001). "Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function." Cell 107(4): 489-99.

Kristel De Boule¹, Annemieke J.M.H. Verkerk², Edwin Reyniers¹, Lieve Vits¹, Jan Hendrickx¹, Bernadette Van Roy¹, Feikje Van Den Bos³, Esther de Graaff², Ben A. Oostra⁴ & Patrick J. Willems¹ (1993). "A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation." Nat Genet 3(1): 31-5.

Denman, R. B. (2003). "Deja vu all over again: FMRP binds U-rich target mRNAs." Biochem Biophys Res Commun 310(1): 1-7.

Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. (1993). "The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation." Nat Genet 4(4): 335-40.

Didiot MC, Tian Z, Schaeffer C, Subramanian M, Mandel JL, Moine H. (2008). "The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer." Nucleic Acids Res 36(15): 4902-12.

Doel, M. T., M. Houghton, E. A. Cook and N. H. Carey (1977). "The presence of ovalbumin mRNA coding sequences in multiple restriction fragments of chicken DNA." Nucleic Acids Res 4(11): 3701-13.

Dolzhanskaya, N., G. Merz, Aletta, J. M., and Denman, R. B. (2006). "Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein." Biochemistry 45(34): 10385-93.

Dombrowski, C., S. Levesque, Morel ML, Rouillard P, Morgan K, Rousseau F. (2002). "Premutation and intermediate-size FMR1 alleles in 10572 males from the general population: loss of an AGG interruption is a late event in the generation of fragile X syndrome alleles." Hum Mol Genet 11(4): 371-8.

Dunn, A. R. and J. A. Hassell (1977). "A novel method to map transcripts: evidence for homology between an adenovirus mRNA and discrete multiple regions of the viral genome." Cell 12(1): 23-36.

Eichler EE, Holden JJ, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN, Richards CS, Ward PA, Nelson DL. (1994). "Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene." Nat Genet 8(1): 88-94.

Eichler, E. E., J. N. Macpherson, A. Murray, P.A. Jacobs, A. Chakravarti and D.L. Nelson (1996). "Haplotype and interspersed analysis of the FMR1 CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome." Hum Mol Genet 5(3): 319-30.

Farzin F, Perry H, Hessel D, Loesch D, Cohen J, Bacalman S, Gane L, Tassone F, Hagerman P, Hagerman R. (2006). "Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation." J Dev Behav Pediatr 27(2 Suppl): S137-44.

Yue Feng, Devin Absher, Derek E Eberhart, Victoria Brown, Henry E Malter and Stephen T Warren (1997). "FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association." Mol Cell 1(1): 109-18.

Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST, Hersch SM. (1997). "Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes." J Neurosci 17(5): 1539-47.

Fernandez-Carvajal, I., B. Lopez Posadas, Pan, RQ; Raske, C; Hagerman, PJ; Tassone, F (2009). "Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations." J Mol Diagn 11(4): 306-10.

Fisch, G. S. (1993). "What is associated with the fragile X syndrome?" Am J Med Genet 48(2): 112-21.

Flannery, A. V., M. C. Hirst, Knight, S. J., Ritchie, R. J. and Davies, K. E.. (1995). "The fragile X syndrome." Biochim Biophys Acta 1271(2-3): 293-303.

Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST. (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.

Gilbert, W. (1978). "Why genes in pieces?" Nature 271(5645): 501.

Gray, A. C., J. Raingo, Lipscombe D. (2007). "Neuronal calcium channels: splicing for optimal performance." Cell Calcium 42(4-5): 409-17.

Greco CM, Berman RF, Martin RM, Tassone F, Schwartz PH, Chang A, Trapp BD, Iwahashi C, Brunberg J, Grigsby J, Hessler D, Becker EJ, Papazian J, Leehey MA, Hagerman RJ, Hagerman PJ. (2006). "Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)." Brain 129(Pt 1): 243-55.

Greenough WT, Klintsova AY, Irwin SA, Galvez R, Bates KE, Weiler IJ. (2001). "Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein." Proc Natl Acad Sci U S A 98(13): 7101-6.

Haddad LA, Aguiar MJ, Costa SS, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SD (1999). "Fully mutated and gray-zone FRAXA alleles in Brazilian mentally retarded boys." Am J Med Genet 84(3): 198-201.

Haddad LA, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SD. (1996). "A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males." Hum Genet 97(6): 808-12.

Hagerman, P. J. and R. J. Hagerman (2004). "Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)." Ment Retard Dev Disabil Res Rev 10(1): 25-30.

Hagerman, R. J., A. E. Chudley, Knoll JH, Jackson AW 3d, Kemper M, Ahmad R. (1986). "Autism in fragile X females." Am J Med Genet 23(1-2): 375-80.

Hagerman, R. J. and P. J. Hagerman (2001). "[Fragile X syndrome: a model of gene-brain-behaviour relationships]." Rev Neurol 33 Suppl 1: S51-7.

Hagerman, R. J. and P. J. Hagerman (2002). "The fragile X premutation: into the phenotypic fold." Curr Opin Genet Dev 12(3): 278-83.

Hagerman RJ, Hills J, Scharfenaker S, Lewis H. (1999). "Fragile X syndrome and selective mutism." Am J Med Genet 83(4): 313-7.

Randi J. Hagerman MD1, Carey Jackson MD1, Khaled Amiri 1, (1992). "Girls with fragile X syndrome: physical and neurocognitive status and outcome." Pediatrics 89(3): 395-400.

Hagerman, R. J., Leavitt, B. R., Farzin, F., Jacquemont, S., Greco, C. M., Brunberg, J. A. (2004). "Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation." Am J Hum Genet 74(5): 1051-6.

Hanke, J., Brett, D., Zastrow, I., Aydin, (1999). "Alternative splicing of human genes: more the rule than the exception?" Trends Genet 15(10): 389-90.

Hecht, F. (1986). "Rare, polymorphic, and common fragile sites: a classification." Hum Genet 74(2): 207-8.

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 T, Li LY, Shen Y, Qin XB, Pang ZL, Wu GY. (1996). "Alternative splicing of the FMR1 gene in human fetal brain neurons." Am J Med Genet 64(2): 252-5.

Huang, Y. S. and J. D. Richter (2004). "Regulation of local mRNA translation." Curr Opin Cell Biol 16(3): 308-13.

Jacquemont, S. (2005). "Screening for FXTAS." Eur J Hum Genet 13(1): 2-3.

Jacquemont S, Farzin F, Hall D, Leehey M, Tassone F, Gane L, Zhang L, (2004). "Aging in individuals with the FMR1 mutation." Am J Ment Retard 109(2): 154-64.

Jin P, Alish RS, Warren ST. (2004). "RNA and microRNAs in fragile X mental retardation." Nat Cell Biol 6(11): 1048-53.

Jin, P. and S. T. Warren (2003). "New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors." Trends Biochem Sci 28(3): 152-8.

Jontes, J. D. and S. J. Smith (2000). "Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity." Neuron 27(1): 11-4.

Kenneson, A., F. Zhang, 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(14): 1449-54.

Konarska, M. M., R. A. Padgett, Sharp PA. (1985). "Trans splicing of mRNA precursors in vitro." Cell 42(1): 165-71.

Konarska, M. M. and P. A. Sharp (1987). "Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosomes." Cell 49(6): 763-74.

Lerner MR, Boyle JA, Mount SM, Wolin SL, Steitz JA. (1980). "Are snRNPs involved in splicing?" Nature 283(5743): 220-4.

Li, Q., J. A. Lee, Black DL. (2007). "Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing." Nat Rev Neurosci 8(11): 819-31.

Li, Z., Y. Zhang, Ku,L., (2001). "The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA." Nucleic Acids Res 29(11): 2276-83.

Lugenbeel, K. A. and A. M. Peier (1995). "Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome." Nat Genet 10(4): 483-5.

Maddalena, A., C. S. Richards, McGinniss MJ, Brothman A, Desnick RJ, Grier RE, Hirsch B, Jacky P, McDowell GA, Popovich B, Watson M, Wolff DJ. (2001). "Technical standards and guidelines for fragile X: the first of a series of disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics. Quality Assurance Subcommittee of the Laboratory Practice Committee." Genet Med 3(3): 200-5.

Maes, B., J. P. Fryns, Ghesquière P, Borghgraef M. (2000). "Phenotypic checklist to screen for fragile X syndrome in people with mental retardation." Ment Retard 38(3): 207-15.

Marozzi, A., W. Vegetti, Emanuela Manfredini, Maria Grazia Tibiletti, (2000). "Association between idiopathic premature ovarian failure and fragile X premutation." Hum Reprod 15(1): 197-202.

Mingroni-Netto, R. C., L. A. Haddad, Vianna-Morgante AM. (1996). "The number of CGG repeats of the FMR1 locus in premutated and fully mutated heterozygotes and their offspring: implications for the origin of mosaicism." Am J Med Genet 64(2): 270-3.

Mitchell, R. J., J. J. Holden, Zhang C (2005). "FMR1 alleles in Tasmania: a screening study of the special educational needs population." Clin Genet 67(1): 38-46.

Murray, A., J. N. Macpherson, Pound MC, Sharrock A, Youings SA, Dennis NR, McKechnie N, Linehan P, Morton NE, Jacobs PA. (1997). "The role of size, sequence and haplotype in the stability of FRAXA and FRAXE alleles during transmission." Hum Mol Genet 6(2): 173-84.

Nimchinsky, E. A., A. M. Oberlander, Svoboda K. (2001). "Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice." J Neurosci 21(14): 5139-46.

Nolin, S. L., W. T. Brown, Glicksman A, Houck GE Jr, Gargano AD, Sullivan A, Biancalana V, Brøndum-Nielsen K, Hjalgrim H, Holinski-Feder E, Kooy F, Longshore J, Macpherson J, Mandel JL, Matthijs G, Rousseau F, Steinbach P, Väisänen 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.

Oberle, I., F. Rousseau, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boué 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.

Oostra, B. A. (2002). "Functions of the fragile X protein." Trends Mol Med 8(3): 102-3.

Oostra, B. A. and R. Willemsen (2003). "A fragile balance: FMR1 expression levels." Hum Mol Genet 12 Spec No 2: R249-57.

Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA. (1986). "Splicing of messenger RNA precursors." Annu Rev Biochem 55: 1119-50.

Parker, R., P. G. Siliciano, Guthrie C. (1987). "Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA." Cell 49(2): 229-39.

Parrish, J. E., B. A. Oostra, Verkerk AJ, Richards CS, Reynolds J, Spikes AS (1994). "Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE." Nat Genet 8(3): 229-35.

Pozdnyakova, I. and L. Regan (2005). "New insights into Fragile X syndrome. Relating genotype to phenotype at the molecular level." Febs J 272(3): 872-8.

Primerano, B., F. Tassone, Hagerman RJ, (2002). "Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations." Rna 8(12): 1482-8.

Queiroz, Mariana Arzua (2006). "Avaliação de Pré-Mutação por PCR na Síndrome do X Frágil". Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 89pp.
<http://www2.enq.ufsc.br/teses/m166.pdf>

Ramos, F. J., B. S. Emanuel, Spinner NB. (1992). "Frequency of the common fragile site at Xq27.2 under conditions of thymidylate stress: implications for cytogenetic diagnosis of the fragile-X syndrome." Am J Med Genet 42(6): 835-8.

Reiss AL, Abrams MT, Greenlaw R, Freund L, Denckla MB.. (1995). "Neurodevelopmental effects of the FMR-1 full mutation in humans." Nat Med 1(2): 159-67.

Reyniers, E., L. Vits, De Boulle K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, Verkerk AJ, Jorens HZ, Darby JK, Oostra B, (1993). "The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm." Nat Genet 4(2): 143-6.

Rogers, J. and R. Wall (1980). "A mechanism for RNA splicing." Proc Natl Acad Sci U S A 77(4): 1877-9.

Ruskin, B., A. R. Krainer, Maniatis T, (1984). "Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro." Cell 38(1): 317-31.

Sambrook, J. (1977). "Adenovirus amazes at Cold Spring Harbor." Nature 268(5616): 101-4.

Santoro, N. (2003). "Mechanisms of premature ovarian failure." Ann Endocrinol (Paris) 64(2): 87-92.

Sarafidou, T., C. Kahl, Martinez-Garay I, Mangelsdorf M, Gesk S, Baker E, (2004). "Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein." Genomics 84(1): 69-81.

Schaeffer, C., M. Beaulande, Ehresmann C, Ehresmann B, (2003). "The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links." Biol Cell 95(3-4): 221-8.

Schellenberg, M. J., D. B. Ritchie, MacMillan AM. (2008). "Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition." Trends Biochem Sci 33(6): 243-6.

Serpa, G. (2008). "Genômica do X-Frágil: Elementos de Regulação do Gene FMR1". Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 76pp. <http://www2.enq.ufsc.br/teses/d057.pdf>

Sherman, S. L. (2000). "Premature ovarian failure in the fragile X syndrome." Am J Med Genet 97(3): 189-94.

Sherman, S. L., F. Marsteller, Abramowitz AJ, Scott E, Leslie M, Bregman J. (2002). "Cognitive and behavioral performance among FMR1 high-repeat allele carriers surveyed from special education classes." Am J Med Genet 114(4): 458-65.

Sherman, S. L., N. E. Morton, Jacobs PA, Turner G. (1984). "The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis." Ann Hum Genet 48(Pt 1): 21-37.

Siomi, M. C., Y. Zhang, H Siomi, and G Dreyfuss (1996). "Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them." Mol Cell Biol 16(7): 3825-32.

Sorek, R., R. Shamir, Ast G. (2004). "How prevalent is functional alternative splicing in the human genome?" Trends Genet 20(2): 68-71.

Sullivan, A. K., D. C. Crawford, Scott EH, Leslie ML., (2002). "Paternally transmitted FMR1 alleles are less stable than maternally transmitted alleles in the common and intermediate size range." Am J Hum Genet 70(6): 1532-44.

Sullivan, A. K., M. Marcus, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ (2005). "Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction." Hum Reprod 20(2): 402-12.

Sung, Y. J., J. Conti, Currie JR. (2000). "RNAs that interact with the fragile X syndrome RNA binding protein FMRP." Biochem Biophys Res Commun 275(3): 973-80.

Sutherland, G. R. (1985). "Heritable fragile sites on human chromosomes. XII. Population cytogenetics." Ann Hum Genet 49(Pt 2): 153-61.

Tassone, F. and P. J. Hagerman (2003). "Expression of the FMR1 gene." Cytogenet Genome Res 100(1-4): 124-8.

Tassone, F., R. J. Hagerman, Loesch DZ, Lachiewicz A, Taylor AK (2000). "Transcription of the FMR1 gene in individuals with fragile X syndrome." Am J Med Genet 97(3): 195-203.

Tassone, F., C. Iwahashi, Hagerman PJ. (2004). "FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)." RNA Biol 1(2): 103-5.

Tassone, F., J. Longshore, Zurich J, Steinbach P. (1999). "Tissue-specific methylation differences in a fragile X premutation carrier." Clin Genet 55(5): 346-51.

Turner, G., C. Eastman, Casey J, McLeay A, Procopic P, Turner B (1975). "X-linked mental retardation associated with macro-orchidism." J Med Genet 12(4): 367-71.

Van Esch, H. (2006). "The Fragile X premutation: new insights and clinical consequences." Eur J Med Genet 49(1): 1-8.

Verkerk, A. J., E. de Graaff, De Boule K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E, Manca A, Poustka A, Willems PJ, Nelson DL, (1993). "Alternative splicing in the fragile X gene FMR1." Hum Mol Genet 2(4): 399-404.

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

Wang, Y. C., M. L. Lin, Lin SJ, Li YC, Li SY. (1997). "Novel point mutation within intron 10 of FMR-1 gene causing fragile X syndrome." Hum Mutat 10(5): 393-9.

Wiegers, A. M., L. B. DeVries, Curfs LM, Fryns JP. (1993). "Identical psychological profile and behaviour pattern in different types of mutation in the FMR-1 region." Clin Genet 43(6): 326-7.

Wu, S., C. M. Romfo, Nilsen TW, Green MR. (1999). "Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35." Nature 402(6763): 832-5.

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

Zamore, P. D. and M. R. Green (1989). "Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor." Proc Natl Acad Sci U S A 86(23): 9243-7.

Zhang, Y., J. P. O'Connor, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL, Dreyfuss G. (1995). "The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2." Embo J 14(21): 5358-66.

Zhou, Z., L. J. Licklider, Gygi SP, Reed R. (2002). "Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome." Nature 419(6903): 182-5.

ANEXO 1 -

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, Maria Cristina Pamplona da Silva, sou aluna de mestrado pela UFSC e Bioquímica do Laboratório Neurogene, realizarei no ano de 2007/2008 uma PESQUISA de “VERIFICAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE PROTEÍNAS PRODUZIDAS PELO GENE FMR1, RESPONSÁVEL PELA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA FMRP”. Para realizar esta pesquisa será necessário coletar 5 ml de sangue para comprovação de algum erro na produção da proteína FMRP que pode ser a causa da ocorrência da Síndrome do X-Frágil. As técnicas que serão utilizadas são: PCR para pesquisa de X-Frágil e eletroforese para verificação dos resultados.

Para realização deste projeto, peço seu consentimento para coleta de sangue de onde será extraído mRNA e o uso dos registros de dados dos pacientes referentes à idade, sexo, naturalidade e indicação clínica existentes no Laboratório Neurogene.

- Esta pesquisa beneficiará as crianças com a Síndrome do X Frágil no que diz respeito a possível causa da doença.
- Prejuízos não são esperados.
- Serão analisados dados do prontuário e questionário do paciente.
- Aqueles que participarem da pesquisa poderão a qualquer momento interromper a pesquisa (somente terá que se comunicar ao pesquisador por telefone, carta ou e-mail).
- Este teste não terá custo para o paciente.
- O pesquisador se compromete a respeitar a privacidade dos sujeitos da pesquisa, quando solicitado pela família, não expondo imagem, dados do prontuário, questionário ou qualquer ponto considerado privado.
- A pesquisa será confidencial no que diz respeito às informações recebidas através dos exames realizados.

Após lido este termo, eu.....
como responsável, com CPF n^o.....,
moradia na Rua
Bairro.....Cidade:.....Estado:.....Cep:.....

PARTICIPAREI DESTA PESQUISA E/OU CONSINTO QUE
.....PARTICIPE DESTA
PESQUISA.

Data:...../...../.....

.....
PESQUISADORA RESPONSÁVEL

Maria Cristina Pamplona da Silva