Fernando Janczur Velloso

Variabilidade do domínio KH-2 da proteína do retardo mental do X frágil (FMRP)

SÃO PAULO
2013

Fernando Janczur Velloso

Variabilidade do domínio KH-2 da proteína do retardo mental do X frágil (FMRP)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em ciências na área de Biologia/Genética

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad

SÃO PAULO

2013

VELLOSO, FERNANDO JANCZUR

Variabilidade do domínio KH-2 da proteína do retardo mental do X frágil (FMRP)

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

1. Gene do Retardo Mental do X Frágil 2. *Splicing* alternativo 3. Proteína do Retardo Mental do X Frágil 4. Domínio KH

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

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).
Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).

Orientadora

À minha família, Alcir, Christine e Julia

À Juliana, minha grande companheira

Agradecimentos

À minha família pelo grande apoio, incentivo e confiança.

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciana A. Haddad, pelo amadurecimento científico.

À Profa. Dra. Silvana Chiavegatto, pela colaboração e supervisão no desenvolvimento e análise dos experimentos de PCR em tempo real.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto pela colaboração e supervisão no desenvolvimento e análise dos experimentos de imunoistoquímica e imunofluorescência.

Ao Adilson Silva Alves (ICB-USP), pelo suporte ao criostato e experimentos de imunoistoquímica.

À Profa. Dra. Lea T Grinberg e a biomédica Edilaine Tampelini Santos do laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento (GEROLAB), pela colaboração, fornecimento de amostras de cérebro humano e discussão dos experimentos.

Aos Profs. Dr Henning Ulrich (IQ-USP) e Dra Telma Schwindt (ICB-USP) e à bióloga Alexandra Saona-Marín, pela colaboração no desenvolvimento de experimentos de neuroesferas.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto (IB-USP), os biólogos Thiago Gerônimo Alegria e Simone Vidigal Alves, pela colaboração no desenvolvimento e análise dos experimentos de cromatografia de exclusão molecular e cultura de bactérias.

Ao Prof. Dr. Alberto Ribeiro e o biólogo Waldir Caldeira, pela realização das análises de microscopia confocal.

Aos Profs. Dra. Regina Célia Mingronni Netto, Dra. Angela M Vianna Morgante e Dr. Eduardo Gorab, pelo apoio e uso das instalações de seus laboratórios.

Aos Profs. Dr Édouard Khandjian (Université du Laval, Québec, Canadá) e Dra. Barbara Bardoni (Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, França) pelas sugestões aos experimentos com complexos ribonucleoproteicos.

À Profa. Dra. Mary Sogayar (IQ-USP) pelo incentivo e enriquecimento científico na disciplina “Biologia Molecular da Transformação Maligna”.

Às Profas. Dra. Maria Rita dos Santos Passos-Bueno e Dra Mariz Vainzhof (IB-USP) pelo uso das instalações do Centro de Estudos do Genoma Humano.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva: Fátima, Teresa, Mara, Paulo Rogério e Maraisa pelo suporte ao longo destes anos.

Aos ex-alunos do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva Larissa Fontes, Rafaella Nascimento e Leonardo Capelli pela amizade e apoio.

Aos meus colegas de laboratório: Marcelo Valpeteris, Luiz Gustavo Dufner e Daniele Rosado pelo convívio diário e também por estarem sempre disponíveis a me auxiliar em meus experimentos.

À Ana Carla Batissoco e a sua família pela amizade e incentivo.

À Deborah Azzi-Nogueira pela grande e sincera amizade e pelo seu apoio ao longo de todos esses anos.

À Juliana Corrêa por todo seu amor, companheirismo, dedicação e paciência. E por estar sempre presente na minha vida, dentro e fora do laboratório.

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo à orientadora (FAPESP Proc. 2008/53857-8 e 2011/14329-9) e do Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) ao aluno.

ÍNDICE GERAL

RESUMO..... XVII
ABSTRACT..... XX
PREFÁCIO..... XXIV
1. INTRODUÇÃO..... 1
1.1. A proteína FMRP e a família FXR..... 4
1.2. Funções e distribuição subcelular da FMRP..... 10
1.3. Domínios funcionais da proteína FMRP..... 14
1.3.1. Domínio Tudor..... 15
1.3.2. Domínio RGG..... 17
1.3.3. Domínios KH..... 18
1.4. FMRP em células progenitoras..... 23
1.5. Variabilidade de tamanho da alça variável do domínio KH-2 da FMRP..... 24
2. OBJETIVOS..... 27
3. MATERIAL E MÉTODOS..... 28
3.1. Material..... 28
3.1.1. Animais e obtenção de encéfalos..... 28
3.1.2. Amostras de tecido cerebral humano..... 29
3.1.3. Linhagens celulares imortalizadas..... 30
3.1.4. Anticorpos..... 30
3.1.5. Oligonucleotídeos..... 32
3.2. Métodos..... 34
3.2.1. Pré-adsorção do anticorpo 3460..... 34
3.2.2. Imunoistoquímica..... 34
3.2.3. Imunofluorescência indireta de tecido..... 36
3.2.4. Análise dos níveis de RNAm de transcritos do *FMR1*..... 37
3.2.4.1. Preparo de água-DEPC estéril..... 37
3.2.4.2. Extração de RNA total..... 37
3.2.4.3. Extração de DNA genômico..... 38
3.2.4.4. Sexagem molecular..... 39
3.2.4.5. Extração de RNA total a partir de cérebro humano. 40
3.2.4.6. Quantificação de RNA..... 40

3.2.4.7. Síntese de cDNA..... 41
3.2.4.8. Teste dos cDNAs..... 42
3.2.4.9. Reação de qRT-PCR..... 42
3.2.5. Lisados de córtex cerebral de rato..... 44
3.2.6. Cromatografia de exclusão molecular..... 45
3.2.7. *Western blotting*..... 46
3.2.8. Cultivo em suspensão de células progenitoras neuro-gliais da vesícula telencefálica de rato em E14 47
3.2.9. Imunofluorescência indireta de células 50
3.2.10. Ensaio de interferência por RNA..... 50
4. RESULTADOS..... 52
4.1. Distribuição de isoformas $FMRP_{+12}ISO$ no encéfalo de rato em P12..... 52
4.2. Expressão do éxon 12 do *Fmr1* na vesícula telencefálica de rato em E14..... 87
4.3. Expressão das $FMRP_{+12}ISO$ no desenvolvimento telencefálico embrionário..... 92
4.4. Expressão *in vitro* das $FMRP_{+12}ISO$ em precursores de neurônios e após diferenciação neuronal..... 102
4.5. O éxon 12 do *FMR1* no córtex cerebral frontal humano em envelhecimento..... 111
4.6. Avaliação de retenção intrônica em transcritos do *FMR1*..... 115
5. DISCUSSÃO..... 117
5.1. A expressão da FMRP entre os períodos embrionário e pós-natal do animal jovem..... 120
5.2. A FMRP e o córtex cerebral..... 128
5.3. A FMRP e o cerebelo..... 133
5.4. A FMRP e o hipocampo..... 135
5.5. A FMRP e células-tronco neurais pós-natais..... 139
5.6. A FMRP no envelhecimento cerebral 141
5.7. A configuraçãoo longa da alça variável do domínio KH-2 da FMRP 143
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 147

7. ANEXO.Manuscrito em preparação..... 167

Índice de figuras

Figura 1: Representação esquemática do gene *FMR1*..... 2
Figura 2: Alinhamento das proteínas da família FXR..... 5
Figura 3: Modelo da atuação funcional da proteína FMRP no neurônio 14
Figura 4: Representação esquemática dos domínios de ligação a RNA da proteína FMRP..... 24
Figura 5: Padronização da pré-adsorção do anticorpo p3460..... 54
Figura 6: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 58
Figura 7: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 59
Figura 8: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 61
Figura 9: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 62
Figura 10: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 63
Figura 11: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 65
Figura 12: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 66
Figura 13: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 68
Figura 14: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 70
Figura 15: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 71
Figura 16: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 72
Figura 17: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 73
Figura 18: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 74
Figura 19: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12..... 75
Figura 20: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12 com coloração Giemsa..... 77
Figura 21: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12 com coloração Giemsa..... 78
Figura 22: Imunoistoquímica em encéfalo de ratos em P12 com coloração Giemsa..... 80
Figura 23: Imunofluorescência em encáfalos de rato em em P12..... 81
Figura 24: Análise de cromatografia de filtração em gel (HPLC) em lisado obtido de córtex frontal de ratos em P12..... 86
Figura 25: Níveis relativos de expressão do transcrito do gene *Fmr1* no período embrionário..... 90
Figura 26: Análise de *Western blotting* da proteína FMRP no período

embrionário..... 92
Figura 27: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário..... 94
Figura 28: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário..... 96
Figura 29: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário..... 97
Figura 30: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário..... 98
Figura 31: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário..... 100
Figura 32: Imunoistoquímica no encéfalo de rato no período embrionário..... 101
Figura 33: Imunofluorenscência em precursores neuronais..... 103
Figura 34: Imunofluorenscência em precursores neuronais..... 105
Figura 35: Imunofluorenscência em precursores neuronais..... 107
Figura 36: Níveis relativos de expressão de transcritos do *Fmr1* em células de glioma de rato..... 110
Figura 37: Níveis relativos de expressão dos transcritos do gene *FMR1* no córtex cerebral frontal humano em envelhecimento..... 113
Figura 38: Imunoistoquímica em tecidos de córtex cerebral frontal humano em envelhecimento..... 115
Figura 39: Esquema demostrando a regulação por fosforilação da FMRP na repressão traducional..... 126
Figura 40: Esquema demostrando a maturação das espinhas dendríticas e a formação de sinapses..... 137

Índice de tabelas

Tabela 1: Isoformas da proteína FMRP..... 3

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas diferentes etapas do estudo de expressão dos transcritos do gene *Fmr1* e ensaios de interferência por RNA..... 33

Tabela 3: Resumo das marcações específicas com anticorpos 7G1-1 e soro imune 3460 e, encéfalo de rato em P12..... 82

Lista de acrônimos

C – grau Celsius

ABC – avidina-biotina-peroxidase

BEH-GEEC – Banco de Encéfalos Humanos do Grupo de Estudos em Envelhecimento Cerebral

bFGF – fator de crescimento de fibroblasto básico

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – albumina sérica bovina

CAPPesq – Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

cDNA – DNA complementar

CDR – *Clinical Dementia Rating Scale*

CEUA – Comissão de Ética em Uso Experimental de Animais

CGG – repetições citosina-guanina-guanina

CMV – citomegalovírus

CO_2 – dióxido de carbono

CpG – dinucleotídeos citosina-guanina ligados covalentemente

CSM – sítio de clonagem múltipla

Ct – ciclo de *treshold*

DAB – diaminobenzidina

dATP – 2' desoxiadenosina 5' trifosfato

dCTP – 2' desoxicitidina 5' trifosfato

DEPC – Dietilpirocarbonato

dGTP – desoxiguanosina 5' trifosfato

DIV – dias *in vitro*

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfato

dsRNA – RNA dupla fita

dTTP – 2' desoxitimidina 5' trifosfato

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EGF – fator de crescimento epidérmico

FBS – soro fetal bovino

FM-USP – Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo

FMR1 – Gene do Retardo Mental do X Frágil

FMR1-ISO1-DDK-His e FMR1-ISO7-DDK-His

FMRP – Proteína do Retardo Mental do X Frágil

$FMRP_{-12}ISO$ – isoformas da FMRP que não expressam a sequência codificada pelo éxon 12 do gene *Fmr1*

$FMRP_{+12}ISO$ – isoformas da FMRP que expressam a sequência codificada pelo éxon 12 do gene *Fmr1*

FXPOI – insuficiência ovariana primária associada ao X frágil

FXTAS – síndrome de ataxia e tremor associada ao X frágil

g – unidade de aceleração gravitacional

GSD – tampão constituído por glicina-SDS-DTT

HCl – ácido clorídrico

HEPES – ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

IB-USP – Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo

IgG – imunoglobulina G

kb – quilobase

KCl – cloreto de potássio

kDa – quilodálton

KH-1 – domínio homólogo à ribonucleoproteína heterogênea nuclear K, hnRNP K, do tipo 1

KH-2 – domínio homólogo à ribonucleoproteína heterogênea nuclear K, hnRNP K, do tipo 2

KH_2PO_4 - potássio di-hidrogenofosfato

KOH – hidróxido de potássio

LiCl – cloreto de lítio

M – molar

$MgCl_2$ – cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

Na_2HPO_4 - hidrogenofosfato dissódico

NaCl – cloreto de sódio

Ni^{+2} – Ion Níquel+2

NP-40 – NP-40 Tipo-Tergitol

oligo(dT) – oligo desoxitimina

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*

p – probabilidade

P/S/G – Penicilina-streptomicina-glutamina

pb – pares de base

PB – tampão fosfato

PBS – tampão fosfato salino

pcDNA3.1 – Vetor contendo epitopo FLAG

pCMV6-AC-DDK-His – Vetor contendo epítopos FLAG e Polihistidina

PCR – reação em cadeia da polimerase

PFA – paraformaldeído

pH – potencial hidrogeniônico

Ppia – Peptidilprolil Isomerase A

qPCR – PCR quantitativo

qRT-PCR – RT-PCR quantitativo

RNA – ácido ribonucleico

RNP – Ribonucleoproteína

ROX – Carboxi-X-rodamina

RT-PCR – reação da transcriptase reversa seguida por PCR

SDS – dodecyl sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

siRNA – pequeno RNA de interferência

SXF – síndrome do X frágil

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – tampão constituído de tris base, ácido bórico e EDTA

TBS-T – tampão tris salino adicionado de tween

TCA – ácido tricloroacético

TES – tampão constituído de tris, EDTA e SDS

TRITC – *Tetramethylrhodamine isothiocyanate*

Tspy – Proteína específica de Testículo Ligada ao Y

U – unidade

USP – Universidade de São Paulo

UTR – região não-traduzida de um gene

µg – microgramas

µL – microlitro

µM – micromolar

Resumo

A proteína do retardo mental do X frágil (FMRP), codificada pelo gene do *Retardo Mental do X Frágil* (do inglês, *Fragile Mental Retardation 1*, *FMR1*) tem expressão significativa no encéfalo, gônadas e células proliferativas. A FMRP é uma proteína ligante de RNA, repressora traducional, que transita entre o núcleo celular, grânulos citoplasmáticos e polissomos. Sua associação a RNA pode se dar pelos domínios Tudor N-terminais, dois domínios centrais, com homologia à heteronucleoproteína K (KH) ou motivos RGG, ricos em arginina (R) e glicina (G), C-terminais. A abolição da expressão da FMRP por mutações no gene *FMR1* é a causa mais frequente de deficiência intelectual hereditária entre homens.

Transcritos desse gene sofrem *splicing* alternativo de quatro éxons, podendo gerar até 20 isoformas não redundantes da FMRP. A tradução de RNAm do *FMR1* contendo o éxon 12 causa uma extensão em fase, em 21 aminoácidos na alça variável do segundo domínio KH (KH-2) da FMRP, cujos padrão de expressão e função ainda são desconhecidos. Embora a FMRP tenha alta similaridade com duas proteínas parálogas, proteínas relacionadas à FMRP, FRX1P e FXR2P, ela apresenta algumas características de expressão e função que lhes são próprias. A longa alça variável do domínio KH-2, por exemplo, não é observada nas parálogas e é característica somente de ortólogas da FMRP em mamíferos. Assim, é possível que o estudo deste segmento da proteína traga informações funcionais específicas para o encéfalo de mamífero.

Demonstramos anteriormente, por qRT-PCR, que, em transcritos do *Fmr1* de rato, a expressão da sequência do éxon 12 é regulada ao longo do desenvolvimento pós-natal precoce, de forma diferencialmente positiva no córtex cerebral frontal e cerebelo, em relação ao hipocampo. No presente trabalho, aprofundamos esses estudos, tendo como objetivo a análise cuidadosa da expressão desse éxon em isoformas da FMRP ($FMRP_{+12}ISO$), pelo uso de um anticorpo dirigido ao segmento codificado por ele, em encéfalos do décimo segundo dia pós-natal (P12, controle positivo) ou embrionários. Para tal, foram realizadas análises por imunoistoquímica e, em P12, ensaios de

cromatografia de exclusão molecular de partículas ribonucleoproteicas. Análises de níveis de RNAm e proteicos em fase embrionária (E12 a E20) do encéfalo do rato foram também conduzidas *in vivo* e *in vitro*, em cultivo primário de neuroesferas em suspensão, a partir da dissociação de vesículas telencefálicas de ratos em E14.

Os dados de imunoistoquímica de encéfalo de ratos em P12 indicaram que (i) as camadas granular externa e a camada piramidal externa do córtex cerebral e as células de Purkinje no cerebelo são mais ricas em $FMRP_{+12}ISO$; (ii) o giro denteado e CA3 foram fontes de $FMRP_{+12}ISO$ no hipocampo, porém em mais baixa intensidade; e (iii) o conjunto das isoformas da FMRP, incluindo as $FMRP_{+12}ISO$, foram expressas em região periventricular dos ventrículos laterais em período pós-natal, sugestivo de células-tronco neurais do adulto ou recém diferenciadas. No córtex cerebral, as $FMRP_{+12}ISO$ foram expressas em áreas motora (segmento rostrodorsal), sensorial (segmentos dorsolaterais a laterais), auditiva (segmentos dorsolaterais), olfatória (córtex piriforme) e visual (segmentos ventrolaterais), além da área do cingulado (segmentos mediais) de ambos os hemisférios cerebrais. Os dados também confirmaram que, em P12, as $FMRP_{+12}ISO$ têm expressão mais pronunciada no córtex cerebral e cerebelo do que no hipocampo. À cromatografia, as $FMRP_{+12}ISO$ tiveram o mesmo padrão de distribuição que o conjunto das isoformas da FMRP, fracionando em complexos ribonucleoproteicos maiores que 600 kDa.

De modo geral, a expressão das $FMRP_{+12}ISO$ foi baixa em E12 e E14. Houve concordância entre as análises por qRT-PCR, *Western blotting* e imunoistoquímica, corroborando a baixa expressão do éxon 12 do *FMR1* na vesículas telencefálicas em E14. Observamos por imunoistoquímica poucas células sugestivas de progenitoras, na base do neuroepitélio, que expressassem $FMRP_{+12}ISO$ ou outras isoformas da FMRP. O córtex cerebral em E20 foi raramente positivo para $FMRP_{+12}ISO$ ou o conjunto das isoformas da FMRP. Por outro lado, células da camada mais superficial da placa cortical, indicativa de ser a camada I, mostraram expressão de isoformas da FMRP sem o segmento codificado pelo éxon 12 do *Fmr1* em E18 e da FMRP, incluindo as $FMRP_{+12}ISO$, em E20, de forma contínua em várias regiões corticais.

Em neuroesferas em suspensão, a expressão das $FMRP_{+12}ISO$ foi muito baixa enquanto isoformas da FMRP, supostamente com a alça variável de KH-2 em sua conformação curta, tiveram alta expressão nessas células. Desde as primeiras 24 horas sob condições de diferenciação neuronal *in vitro*, células de neuroesferas aumentaram a expressão das $FMRP_{+12}ISO$, que se mantiveram alta no período analisado (12 dias *in vitro*), colocalizando-se com outras isoformas da FMRP. Ensaios preliminares *in vitro* pela interferência do RNA, em células imortalizadas C6, indicaram um RNA em fita dupla, entre dois testados, com capacidade de inibição de mensagens do *Fmr1* que especificamente contenham o éxon 12. A expressão do éxon 12 do *FMR1* no córtex cerebral frontal, humano, em envelhecimento foi baixa pela análise de RNAm, enquanto o total de transcritos deste gene apresentou-se em níveis significativos.

Nossos dados sugerem que a expressão do éxon 12 do *Fmr1* é mais significativa para $FMRP_{+12}ISO$ em células neuronais, durante um período crítico de sinaptogênese, no primeiro mês pós-natal do rato. O tecido telencefálico, embrionário não se mostrou uma fonte rica dessas isoformas, principalmente em células indiferenciadas, que foram francamente negativas.

Abstract

Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP), codified by Fragile Mental Retardation 1 (*FMR1*) gene, is significantly expressed in the brain, gonads and proliferative cells. FMRP is an RNA-binding protein and acts as a translation repressor, which transits between cell nucleus, cytoplasmic granules and polysomes. Its association with RNA occurs via several domains, namely: N-terminal Tudor domains; two central domains with K-heteronucleoprotein (KH) homology; and C-terminal RGG motifs, that are rich in arginine (R) and glicine (G). The absence of FMRP expression triggered by mutations in the *FMR1* gene is the most frequent cause of hereditary intellectual disability in human men.

Four *FMR1* exons may undergo alternative splicing, generating up to 20 non-redundant FMRP isoforms. The translation of the *FMR1* mRNA containing exon 12 leads to an in-phase extension of 21 amino acids in the variable loop on FMRP the second KH domain (KH-2). The pattern of expression and function of this isoform are unknown. Although FMRP is highly similar to two paralogs proteins, FMRP-related proteins FRX1P and FRX2P, it presents some unique expression and function characteristics. The long variable loop of the KH-2 domain, for example, is not observed in these paralogs and is a hallmark of FMRP mammal orthologs. Therefore, the study of this protein segment can potentially bring information about its function specifically in the mammalian brain.

Using qRT-PCR and Western blotting, we previously demonstrated that, for rat *Fmr1* transcripts, the expression of sequences containing exon 12 is

regulated during early postnatal development. In this period, expression of these segments in the frontal cerebral cortex and in the cerebellum is higher when compared to hippocampus expression. In the present work, we deepened these studies with the objective of carefully analysing the expression of FMRP isoforms containing FMRP exon 12 ($FMRP_{+12}ISO$). For this purpose, we employed rat postnatal brains at the twelfth postnatal day (P12, used as a positive control) and rat embryo brain in immunohistochemistry assays with antibodies detecting peptides codified by exon 12. In this strategy, we also carried out molecular exclusion chromatography of ribonucleoproteins particles with lysates from rat P12 encephalon. Analysis of mRNA and protein levels in rat brain in the embryonic period [embryonic days 12 to 20 (E12 to E20)] were conducted *in vivo* and *in vitro*, in neurosphere suspension primary cultures, obtained by dissociation of telencephalic vesicles from E14 rats.

Immunohistochemical data from P12 rat brain indicated that (i) the granular external layers and pyramidal external layer in the brain cortex and Purkinje cells in the cerebellum are richer in $FMRP+_{12}ISO$; (ii) in the hippocampus, $FMRP+_{12}ISO$ can be found in dentate gyrus and CA3, although in lesser intensities; and (iii) FMRP isoforms, including $FMRP+_{12}ISO$, are expressed in the periventricular regions from the lateral ventricles, suggesting their expression in adult neural stem cells or in differentiating cells. In the cerebral cortex, $FMRP+_{12}ISO$ are expressed in motor areas (rostrodorsal segment) and in sensorial areas (dorsolateral and lateral segments), specifically in auditory (dorsolateral segments), olfactory (piriform cortex) and visual (ventrolateral segments) areas, besides expression in the cingulate area (medial segment) in both hemispheres. Our data also confirmed that, in P12

brain, cerebral cortex and cerebellum have higher FMRP+$_{12}$ISO expression when compared to the hippocampus. Chromatography data indicated that FMRP+$_{12}$ISO have the same pattern of distribution than the FMRP isoform group, fractionating in ribonucleoproteics complexes heavier than 600kDa.

Altogether, FMRP+$_{12}$ISO expression is low in E12 and E14 rat brain. qRT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry data were concordant, corroborating the low expression of exon 12 in E14 telencephalic vesicles. In immunohistochemistry images, we observed few cells with progenitor phenotype, at the basal neuroepithelium, expressing FMRP+$_{12}$ISO or other FMRP isoforms. In E20, cerebral cortex was rarely positive for FMRP+$_{12}$ISO or other FMRP isoforms. Still, cells in the superficial layer of the cortical plate, possibly layer 1, were positive for FMRP isoforms that do not contain the segment codified by exon 12 in E18, brains and positive for the ensemble of FMRP, isoforms, FMRP+$_{12}$ISO included, in E20 brains, in continuous portions of several cortical regions.

In suspension neurosphere cultures, FMRP+$_{12}$ISO expression was very low, while the expression of FMRP isoforms, supposedly with the variable loop of KH-2 in its short conformation, was high in. After 24 hours under neuron differentiation conditions *in vitro*, neurosphere cells showed increasing expression of FMRP+$_{12}$ISO, which remained high during the period analyzed (12 days *in vitro*), co-localizing with other FMRP isoforms. Preliminary assays using RNA interference *in vitro* in an immortalized glioma cell lineage (C6), disclosed a double-stranded RNA, among two tested samples, with the ability to suppress exon 12 containig *Fmr1* mRNA. The expression of *FMR1* transcripts

containing exon 12 in aging human brain frontal cortex was low, while total *FMR1* transcripts levels were significant.

Our data suggest that the expression of exon 12 from *Fmr1* is more significant in rat neuronal cells during a critical period of synaptogenesis in the first postnatal month. The embryonic telencephalic tissue is not rich in $FMRP_{+12}ISO$, which were notably absent from undifferentiated cells.

Prefácio

A proteína do retardo mental do X frágil (FMRP) é codificada pelo gene do *Retardo Mental do X Frágil* (do inglês, *Fragile Mental retardation 1*, *FMR1*) e tem expressão significativa no encéfalo, gônadas e células proliferativas (Bakker *et al.*, 2000; Eichler *et al.*, 1993; Hinds *et al.*, 1993). Foi detectada, após o desenvolvimento de anticorpos a ela dirigidos, como um grupo de isoformas com 60 a 95 kDa após eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (Verheij *et al.*, 1993, 1995), que são produzidas mais provavelmente em virtude do *splicing* alternativo dos éxons 12, 14, 15 ou 17 do *FMR1* (Ashley, C *et al.*, 1993; Verkerk *et al.*, 1993). A FMRP contém domínios encontrados em proteínas ligantes de RNA (Ashley, C. *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1993) e tem atividade reguladora da tradução de RNAs mensageiros (RNAm) de forma relacionada à função sináptica (Huber *et al.*, 2002). O *splicing* alternativo dos transcritos do *FMR1* pode modificar tais domínios da FMRP.

O enfoque deste trabalho é a análise da expressão de isoformas da FMRP que expressam o éxon 12 do gene *FMR1* em células e tecidos, sob condições fisiológicas. As alterações do gene *FMR1* não são nosso objeto de estudo. No entanto, dada a alta prevalência de três afecções clínicas, distintas, causadas por mutações no gene *FMR1*, estas serão brevemente apresentadas neste Prefácio, buscando-se evidenciar a importância desse gene.

O gene *FMR1* compreende cerca de 38 quilobases (Kb), 17 éxons e expressa um RNAm de aproximadamente 4.4 Kb, composto por uma região 5' não traduzida (5'-UTR) de 0.2 Kb, uma região codificante de 1.9 Kb e uma

região 3' não traduzida (3'-UTR) de 2.3 Kb. O gene *FMR1* mapeia-se em Xq27.3 e mutações que abolem a sua expressão podem causar a síndrome do X frágil (SXF), a causa mais frequente de deficiência intelectual hereditária, entre homens (OMIM: #300624) (Fu *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991).

A SXF apresenta herança ligada ao cromossomo X e prevalência de um em cada 4.000 homens e uma em cada 8.000 mulheres (Turner *et al.*, 1996). Apresenta-se clinicamente com atraso no desenvolvimento neuro-psicomotor e da linguagem, culminando em deficiência intelectual de graus moderado a grave, transtornos do comportamento e, menos comumente, crises convulsivas (Lubs *et al.*, 1984; Lubs, 1969). As características faciais, mais distintas em homens, incluem mento proeminente, fronte estreita e alta e pavilhões auriculares com tamanho aumentado e em abano. Estas características físicas se tornam mais acentuadas com a idade, podendo ser observadas, mais frequentemente a partir da puberdade, fase na qual 80% dos homens afetados pela síndrome podem apresentar macrorquidia (Meryash *et al.*, 1984). Outros sinais podem ainda se apresentar em diversos pacientes como alterações do tecido conjuntivo, evidenciadas por hipoplasia da cartilagem auricular e hiperextensibilidade das articulações (Hagerman *et al.*, 1984). Devido ao mapeamento do gene no cromossomo X, os sinais da SXF apresentam-se mais comumente em homens do que em mulheres, nas quais a penetrância depende da proporção de inativação do cromossomo X normal (Loesch and Hay, 1988).

O tipo de mutação que, na grande maioria dos casos, causa a SXF localiza-se em uma região de repetições polimórficas de unidades de

trinucleotídeos de citosina-guanina-guanina (CGG), na região 5' do gene *FMR1*, que é transcrita, mas não traduzida. Entre indivíduos da população geral, o número de repetições varia entre 6 e 40 (alelos comuns), sendo os alelos mais comuns aqueles com 29 e 30 trinucleotídeos. Indivíduos afetados pela SXF apresentam mais de 200 trincas CGG, alelos classificados como mutação completa. Essa expansão no número de repetições acima de 200 leva à metilação da ilha CpG em que se encontram, impedindo o acoplamento da maquinaria de transcrição e resultando no silenciamento do gene. Alelos que possuem entre 55 e 200 repetições são denominados pré-mutação e, apesar de não estarem metilados e não comprometerem a transcrição do gene, eles são instáveis à transmissão materna podendo se expandir a mutação completa (Devys *et al.*, 1993). Alelos intermediários contêm entre 41 e 54 trincas CGG e, embora não apresentem a instabilidade meiótica de pré-mutações, podem sofrer expansões ao número de trincas destas, com maior frequência do que alelos comuns (Montagnon *et al.*, 1994).

Cerca de 30% dos homens portadores de pré-mutações, usualmente os avôs maternos de meninos afetados pela SXF, desenvolvem uma condição clínica de início tardio, caracterizada por tremor de intenção progressivo, marcha atáxica, declínio cognitivo, neuropatia periférica e disfunção autônoma, denominada síndrome de ataxia e tremor associada ao X frágil (FXTAS; OMIM: 300623) (Hagerman *et al.*, 2001). A doença é progressiva e tem, em geral, seus sinais iniciais pela manifestação do tremor, seguido pela ataxia. A média de idade para manifestação do tremor é em torno de 62 anos (47 – 78 anos) e para a ataxia de 63 anos (39 – 78 anos) (Tassone *et al.*, 2007). Ao longo de uma década, a marcha atáxica se agrava, o que pode causar quedas do

paciente e necessidade de auxílio para a deambulação (Leehey *et al.*, 2007). Em poucos casos, o declínio cognitivo pode preceder os sinais motores ou ser um achado isolado (Gonçalves *et al.*, 2007; Grigsby *et al.*, 2006; Sévin *et al.*, 2009). Outros transtornos, como de comportamento, notavelmente sintomas obsessivo-compulsivos ou esquizoides, já foram observados em portadores da pré-mutação, com ou sem FXTAS (Hessl *et al.*, 2005). As mulheres são menos frequentemente afetadas pela FXTAS, principalmente pelo desvio de inativação do cromossomo X (Berry-Kravis *et al.*, 2003; Jacquemont *et al.*, 2004).

O número das repetições CGG correlaciona com a idade de manifestação dos sinais motores de FXTAS, mas não com a gravidade (Tassone *et al.*, 2007). A idade de manifestação do declínio cognitivo relaciona-se diretamente com o número de repetições CGG dentro da faixa de pré-mutação, de forma independente de FXTAS (Gonçalves *et al.*, 2007; Sévin *et al.*, 2009). Outra relação direta foi descrita entre o número de repetições CGG e inclusões intranucleares eosinófilas em neurônios e astrócitos do encéfalo de pacientes com FXTAS (Greco *et al.*, 2006; Jacquemont *et al.*, 2003).

Ao contrário das mutações completas do *FMR1* que causam a SXF, alelos de pré-mutações exibem atividade transcricional (Devys *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1995). Curiosamente, os níveis de RNAm do *FMR1* estão aumentados em células do sistema nervoso central de pacientes com FXTAS, sem, entretanto, qualquer alteração significativa dos níveis da proteína FMRP (Greco *et al.*, 2006; Hessl *et al.*, 2005). Diante desses dados e do achado do RNAm do próprio *FMR1* nas inclusões neuronais e astrocíticas nesses pacientes, propôs-se um modelo patogenético de toxicidade pelo RNAm do

FMR1, no qual alças de repetições CGG na região 5' do transcrito seriam determinantes do processo patológico através do recrutamento molecular, estresse oxidativo e formação de inclusões intracelulares (Garcia-Arocena and Hagerman, 2010).

Mulheres portadoras de alelos pré-mutados ou intermediários podem apresentar insuficiência ovariana primária associada ao X - Frágil (FXPOI) (Hunter *et al.*, 2008), caracterizada pela menopausa precoce, antes dos 40 anos de idade. Nestas mulheres, a disfunção ovariana parece ser dependente do número de repetições CGG, embora esta correlação não seja linear, tendo em vista que portadoras da pré-mutação com variações de 80-100 repetições podem apresentar manifestação precoce de FXPOI. Os mecanismos moleculares inerentes à insuficiência ovariana causada pelo RNAm com repetições CGG ainda são desconhecidos. A hipótese de toxicidade deste RNAm sugerido para a patologia da FXTAS pode ser relevante também para disfunção ovariana observada na FXPOI (Lu *et al.*, 2012).

1. Introdução

Após a clonagem posicional do gene do *Retardo Mental do X Frágil 1* (*FMR1*), em 1991 (Fu *et al.*, 1991; Kremer *et al.*, 1991; Oberle *et al.*, 1991; Verkerk *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991), a caracterização do seu RNAm em tecidos variados levou à identificação inicial de doze variantes de transcritos, expressos em diferentes tecidos humanos (Ashley, C *et al.*, 1993; Eichler *et al.*, 1993; Verkerk *et al.*, 1993). A clonagem do cDNA do *FMR1* expresso em neurônios, cultivados a partir do córtex cerebral de um feto humano de dez semanas, revelou onze transcritos distintos (Huang *et al.*, 1996). No total, foram observados seis eventos de *splicing* alternativo em diferentes éxons no transcrito primário do gene *Fmr1*, responsáveis por gerar essa variabilidade (Ashley, C *et al.*, 1993; Verkerk *et al.*, 1993). Os éxons envolvidos em eventos de *splicing* alternativo concentram-se na metade 3' codificante do gene, sendo eles os éxons 10, 12, 14, 15 e 17.

Um sítio alternativo receptor de *splicing* foi descrito *in silico* no éxon 10 do *FMR1* humano, embora sem verificação experimental (Eichler *et al.*, 1993). Os éxons 12 e 14, denominados éxons-cassete, podem ser integralmente incluídos no ou excluídos do transcrito. Os éxons 15 e 17 possuem três e dois sítios receptores de *splicing*, respectivamente, podendo alterar a extensão da sequência de éxon incluída no RNAm (Fig. 1). Sabe-se, hoje, que a combinação dos eventos de *splicing* alternativo dos éxons 12, 14, 15 e 17 do *Fmr1* tem possibilidade de gerar 24 variantes de RNAm que podem dar origem a 20 isoformas não redundantes da proteína do retardo mental do X frágil (FMRP), cujas massas moleculares estimadas variam de 47,3 a 71,1 quilodáltons (Sittler *et al.*, 1996).

Brackett e colaboradores amplificaram pela reação em cadeia da polimerase (PCR), após transcrição reversa (RT-PCR), doze transcritos diferentes do *Fmr1* de camundongo. A partir de diluições sucessivas desses, analisaram de forma semi-quantitativa os níveis de expressão de cada um, sem, no entanto, avaliar individualmente os éxons que sofrem *splicing* alternativo. Identificou-se alguma expressão para cada um deles, em diversas regiões do encéfalo, durante o desenvolvimento e em células de cultivo primário. Demonstrou-se também que os transcritos variáveis interagem com polirribossomos, indicando que estejam associados à maquinaria de tradução (Brackett *et al.*, 2013).

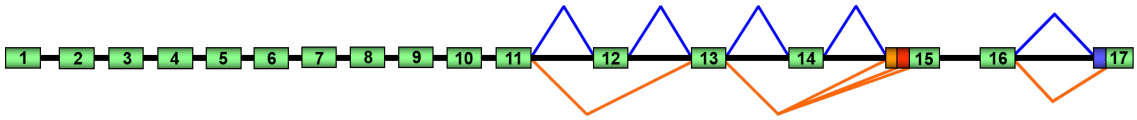

Figura 1: Representação esquemática do gene *FMR1* mostrando os éxons (em verde) e íntrons (barras pretas). As linhas azuis e laranjas representam os respectivos padrões de *splicing* dos éxons alternativos 12, 14, 15 e 17. Os éxons 12 e 14 são éxons cassete, podendo ter toda sua sequência incluída ou excluída do transcrito final. Os éxons 15 e 17 tem sítios doadores de *splicing* alternativos localizados a 5'. Em amarelo, vermelho e verde estão representados os três sítios alternativos de *splicing* do éxon 15 e em azul e verde os dois sítios alternativos do éxon 17.

Transcritos de RNAm com localização dendrítica podem conter íntrons em sua sequência, que não foram removidos durante o *splicing* no núcleo. Foi demonstrado que grande parte destes transcritos com retenção intrônica possuem em seus íntrons elementos retrotranspostos do tipo SINE (do inglês, *short interspersed element*), que podem alterar a localização dos RNAms em que se encontram para a região dendrítica. Foi proposto que a retenção destes íntrons é um evento regulado que altera a distribuição destes transcritos. Nos

transcritos maduros do gene *Fmr1*, foi descrita retenção dos íntrons 1, 7 e 12 em culturas primárias de neurônios obtidas a partir da dissociação de córtex cerebral de camundongo (Buckley *et al.*, 2011).

		1º sítio recep. *splicing* do exon 17		2º sítio recep. *splicing* do exon 17	
			Δ Exon 12		Δ Exon 12
a	Exon 15	ISO 1 (71,1)	ISO 7 (68,9)	ISO 13 (69,1)	ISO 17 (66,9)
b	Exon 15	ISO 2 (69,9)	ISO 8 (67,7)	ISO 14 (67,9)	ISO 18 (65,7)
c	Exon 15	ISO 3 (68,4)	ISO 9 (66,2)	ISO 15 (66,4)	ISO 19 (64,2)
Δ14*a	Exon 15	ISO 4 (50,9)	ISO 10 (48,7)	(ISO 4)	(ISO 10)
Δ14*b	Exon 15	ISO 5 (49,5)	ISO 11 (47,3)	(ISO 5)	(ISO 11)
Δ14*c	Exon 15	ISO 6 (61,0)	ISO 12 (58,8)	ISO 16 (59,0)	ISO 20 (56,8)

Tabela 1: Tabela identificando as isoformas da FMRP esperadas pela tradução das variantes de transcrito do *FMR1* com ou sem (Δ) os éxons 12 e 14, com uso do primeiro ou segundo sítio receptor de *splicing* do éxon 17 ou um dos três sítios receptores de *splicing* do éxon 15 (a, b e c). Encontram-se entre parênteses a massa molecular (kDa) estimada para cada isoforma. Com a exclusão do éxon 14, a nova região potencialmente formada para as isoformas 4, 5, 10 e 11 apresenta um códon de parada prematura da tradução antes do éxon 17. Nestes casos, os transcritos gerados pelo uso do primeiro ou segundo sítio receptor de *splicing* do éxon 17 criam isoformas redundantes. As isoformas estão identificadas por cores em cinco grupos, determinados pela proximidade da massas moleculares calculadas para cada isoforma (verde claro para isoformas de 47,3 a 50,9 kDa; azul para isoformas de 56,8 a 61 kDa; marrom para as que têm massa estimada entre 64,2 e 66,9 kDa; alaranjado para aquelas com 67,7 a 69,9 kDa; e vermelho para a sequência completa originando a isoforma de massa estimada em 71,1 kDa). Fonte: Sitler *et al*, 1996.

1.1 A proteína FMRP e a família FXR

Em vertebrados, a proteína FMRP (632 aminoácidos) faz parte da família FXR (do inglês, *fragile X-related proteins*) formada também pelas proteínas FXR1P (621 aminoácidos) e FXR2P (673 aminoácidos), codificadas

pelos genes autossômicos *FXR1* (3q28) e *FXR2* (17p13.1), respectivamente. Em *Drosophila melanogaster*, há apenas um membro desta família, a proteína dFMRP, cuja similaridade é mais alta com a FMRP (64% com a FMRP; 55% com a FXR2P; e 36% com a FXR1P), sendo a região C-terminal a menos conservada (Wan *et al.*, 2000). Em leveduras e *Caenorhabditis elegans* não são encontrados representantes desta família (Currie and Brown, 1999; Shtang, Perry and Percy, 1999). Em vertebrados, os genes *FMR1*, *FXR1* e *FXR2* têm ortólogos em várias espécies como *Xenopus* (Blonden *et al.*, 2005), *Danio rerio* (*zebrafish*) (Tucker, Richards and Lardelli, 2004), mamíferos (Laval *et al.*, 1992) e outros organismos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview). Em camundongos, as proteínas desta família apresentam similaridade geral de 55% entre si, sendo a região N-terminal a de maior homologia (86% entre FMRP e FXR1P e 70% entre FMRP e FXR2P, Figura 2). A região C-terminal apresenta similaridade mais baixa, com apenas 6% dos resíduos conservados (Tamanini *et al.*, 1999). Em transcritos do *FXR1*, demonstrou-se também a possibilidade de *splicing* alternativo dos éxons equivalentes aos éxons 14, 15 e 17 do *FMR1* (Dubé, Huot and Khandjian, 2000; Kirkpatrick, McIlwain and Nelson, 1999). O segmento do éxon 12 do *FMR1* está ausente nos genes parálogos e nos ortólogos de invertebrados (Kirkpatrick, McIlwain and Nelson, 2001).

As proteínas da família FXR são encontradas em vários tecidos durante o desenvolvimento e apresentam, em alguns deles, um padrão de expressão distinto.

A clonagem de 2,8 Kb de sequência de DNA a 5' do *FMR1* em um vetor para expressão do gene repórter *lacZ* gerou cinco linhagens transgênicas de

camundongo. Nestas, observou-se a expressão do gene repórter no encéfalo embrionário e, no adulto, sobretudo no hipocampo, camada granular do cerebelo, células de Leydig e espermatogônias no testículo, alguns epitélios, células do córtex das adrenais e foliculares do ovário (Hergersberg *et al.*, 1995).

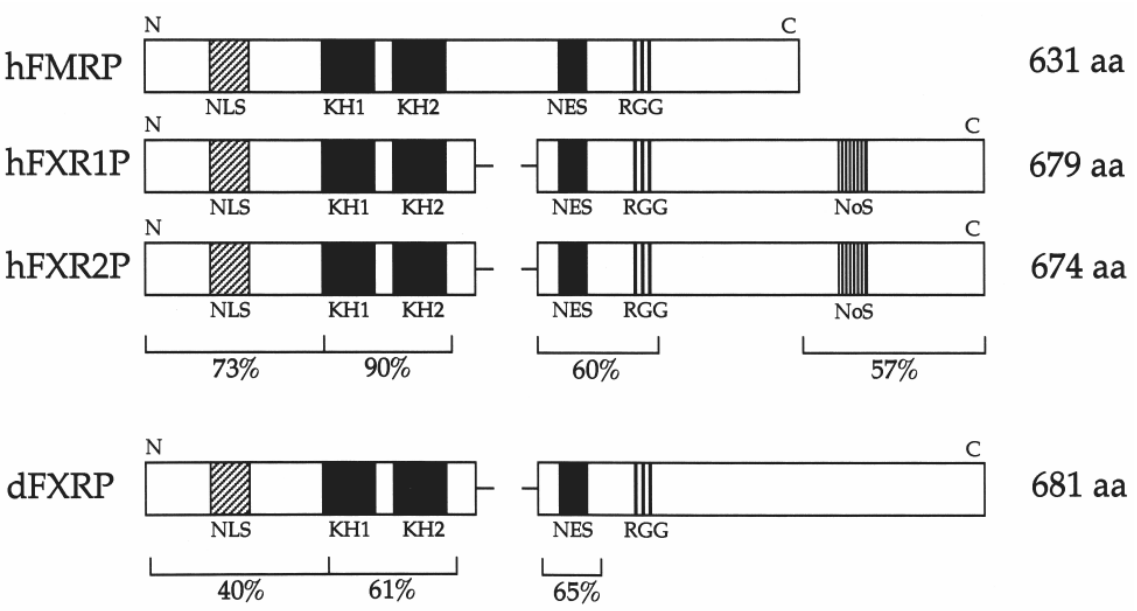

Figura 2: Alinhamento gráfico das proteínas da família FXR na espécie humana e em Drosophila. Os domínios funcionais KH-1, KH-2 e RGG estão discriminados nas três integrantes da família. Em humanos, a região N-terminal apresenta similaridade de 73% entre as três proteínas, sendo a região dos domínios KH a de maior similaridade (90%). (NLS, sinal de localização nuclear; NES sinal de exportação nuclear; NoS: sinal de localização nucleolar). Fonte: Kirkpatrick *et al*., 2001

O RNAm do *Fmr1* foi observado por hibridação *in situ* no embrião de camundongo, sendo detectado a partir do décimo dia embrionário (E10), em todos os tecidos. Após esse período, em E13, E14 e E19, a expressão decai em alguns tecidos, tornando-se mais baixa e específica. Esse padrão é mais evidente no camundongo adulto, que mantém níveis mais altos de expressão no encéfalo, testículos, ovários, esôfago, timo e baço (Devys *et al.*, 1993; Hinds

et al., 1993). Bächner e colaboradores utilizaram a mesma técnica e observaram expressão elevada em células germinativas, em proliferação do camundongo, macho ou fêmea (Bächner *et al.*, 1993).

No embrião humano de oito a nove semanas, o RNAm do *FMR1* é detectado em células proliferativas e pós-mitóticas, migratórias do sistema nervoso. No sistema nervoso central (SNC), células periventriculares são coradas de forma menos intensa do que as de camadas mais superficiais, como as zonas marginal e intermediária. Há marcação também na camada neuroblástica interna do cálice ótico da retina, o qual formará o nervo ótico. Nesse período, a expressão do *FMR1* é também elevada em estruturas cartilaginosas, no mesênquima cefálico (periencefálico, mandibular e língua) e no fígado (Abitbol *et al.*, 1993).

No encéfalo do feto humano de 25 semanas, intensa marcação do RNAm do *FMR1* foi observada nas zonas ventricular e subventricular e na placa cortical. Nesta, células das camadas mais profundas (III-VI) expressaram o *FMR1* em níveis mais altos do que aquelas da camada II. Células da camada I também expressaram esse gene na vigésima quinta semana gestacional do feto humano. O núcleo basal magnocelular apresentou intensa marcação. No hipocampo, a intensidade da marcação foi alta e distribuiu-se igualmente ao longo do corno de Ammon (CA), em suas regiões CA1, CA2 e CA3. O giro denteado também foi positivo. Os hemisférios cerebelares, o núcleo denteado e o vérmis apresentaram-se marcados. Nos hemisférios cerebelares, as células de Purkinje foram as mais intensamente marcadas. Em geral, as células positivas para o *FMR1* tinham morfologia neuronal (Abitbol *et al.*, 1993; Agulhon *et al.*, 1999).

Da mesma forma, a proteína FMRP humana foi observada predominantemente no cérebro, gônadas e epitélio do adulto. No encéfalo, a FMRP é predominantemente neuronal e citoplasmática, enquanto que nos testículos é expressa principalmente em espermatogônias e, nos ovários, em ovócitos e células da granulosa (Agulhon *et al.*, 1999; Bächner *et al.*, 1993; Devys *et al.*, 1993; Khandjian *et al.*, 1995; Tamanini *et al.*, 1997; Verheij *et al.*, 1993). No cerebelo, as células de Purkinje são as mais intensamente marcadas pelo anticorpo anti-FMRP, embora coloração proeminente seja também observada na camada granular. No córtex cerebral, a FMRP distribui-se a neurônios. A imunocoloração está presente em órgãos epiteliais, embora de forma menos significativa do que em neurônios. Nas células epiteliais, a presença da FMRP é mais evidente em células proliferativas (Devys *et al.*, 1993). Nas primeiras semanas pós-natais do rato, os níveis de expressão da FMRP aumentam em resposta à atividade neuronal do hipocampo e córtex cerebral, de forma dependente de exposição a um ambiente complexo ou estímulos sensoriais, específicos, respectivamente (Irwin *et al.*, 2000, 2005; Todd and Mack, 2000; Todd, Malter and Mack, 2003).

A localização da FMRP parece ser primariamente pós-sináptica, no início do período pós-natal no cérebro de roedores (Feng, Gutekunst, *et al.*, 1997; Greenough *et al.*, 2001), podendo também ser encontrada em compartimentos pré-sinápticos (Christie *et al.*, 2009; Feng, Gutekunst, *et al.*, 1997). Em neurônios hipocampais e corticais, a FMRP predomina em espinhas dendríticas, evaginações da membrana pós-sináptica de neurônios excitatórios, que estão sujeitas a alterações morfológicas dinâmicas, relacionadas à função

sináptica e plasticidade neuronal, de forma dependente de síntese proteica (Jontes and Smith, 2000).

O camundongo modelo para a síndrome do X frágil (SXF) tem o gene *Fmr1* deletado (KO) e apresenta disfunção de aprendizado, memória e social (Bakker, Verheij and Willemsen, 1994). Cérebros de pacientes com a SXF e de camundongos KO do *Fmr1* apresentam espinhas dendríticas dismórficas, mais longas, finas e em maior número do que em humanos portadores de alelos comuns ou pré-mutações e do que camundongos de tipo-selvagem, sugerindo que a FMRP deva ter função na maturação e eliminação sináptica (Comery and Harris, 1997; Nimchinsky, Oberlander and Svoboda, 2001).

FXR1P é amplamente encontrada no cérebro, músculo esquelético e cardíaco (Bakker *et al.*, 2000) e, em testículos, é predominantemente expressa em espermátides (Bakker *et al.*, 2000; Tamanini *et al.*, 1997). O camundongo KO do *Fxr1* exibe um fenótipo relacionado a disfunção muscular esquelética (Mientjes *et al.*, 2004).

No cérebro e ovário, a FXR2P tem um padrão de distribuição semelhante à FMRP, embora em intensidade mais baixa (Bakker *et al.*, 2000). Embora o camundongo KO do *Fxr2* não apresente alterações anatomo-patológicas no encéfalo, mostra disfunções de comportamento semelhantes às dos camundongos KO do *Fmr1* (Bontekoe *et al.*, 2002).

Avaliações comparativas das proteínas FMRP, FXR1P e FXR2P, em tecido murino e humano, realizada por imunoistoquímica, revelou que, no encéfalo, as três proteínas têm distribuição celular semelhante, como descrito acima para a FMRP, embora FXR1P tenha sido observada de maneira isolada em neurônios

motores do tronco encefálico. A imunomarcação com conjugação a ouro e observação à microscopia eletrônica revelou as três proteínas no citoplasma de neurônios hipocampais, associadas a polissomos. Somente a FXR1P foi detectada no núcleo de neurônios hipocampais (Bakker *et al.*, 2000; Tamanini *et al.*, 1997).

Zhang e colaboradores isolaram o clone de cDNA de *FXR2* em um ensaio do duplo híbrido da levedura que tinha como isca a expressão do clone de cDNA do *FMR1*. Além da clonagem do *FXR2*, esses dados indicavam interação entre FMRP e FXR2P, a qual foi confirmada por precipitação por afinidade *in vitro* e co-imunoprecipitação *in vivo* (Zhang *et al.*, 1995). O gene *Fxr1* foi identificado por similaridade com a sonda de *FMR1* em uma triagem de biblioteca de cDNA de *Xenopus laevis* (Siomi *et al.*, 1995). Zhang e colaboradores (1995) demonstraram que, além de interagir com a FXR2P, a FMRP tem habilidade para formar heterodímero com a FXR1P e homodímeros. Siomi e colaboradores demonstraram que a sequência codificada pelo éxon 7 do *FMR1* é necessária à formação de homodímeros ou heterodímeros (Siomi *et al.*, 1996). Ensaios de cromatografia de exclusão molecular revelaram que dímeros FXR fracionam em complexos maiores que 600 kDa e que altas concentrações de sal rompem esses complexos, deixando-os com cerca de 200 a 300 kDa (Tamanini and Unen, 1999).

1.2 Funções e distribuição subcelular da FMRP

Dois sinais de localização subcelular permitem que a FMRP, FXR1P e FXR2P trafeguem entre o núcleo e o citoplasma, auxiliando na sua localização intracelular. O primeiro, o sinal de localização nuclear (NLS), é codificado pelo éxon 5 do *Fmr1* e os resíduos localizados nas posições 114-117 da proteína

são essenciais para sua função (Eberhart *et al.*, 1996). O sinal de exportação nuclear (NES) é codificado pelo éxon 14, sendo que os primeiros 17 aminoácidos codificados por este éxon, especialmente os dois resíduos de leucina localizados nas posições 430 e 432 da FMRP são fundamentais para a funcionalidade do NES (Eberhart *et al.*, 1996; Fridell *et al.*, 1996). Este motivo possui uma região rica em leucina semelhante ao NES encontrado na proteína Rev do vírus HIV-1 e permite a transferência para o citoplasma das proteínas que o detêm, através da ligação ao fator de exportação nuclear exportina 1 (Fornerod *et al.*, 1997; Ullman, Powers and Forbes, 1997).

A exclusão do éxon 14 devido ao *splicing* alternativo de transcritos do *FMR1* leva à retenção nuclear da FMRP superexpressa (Bardoni *et al.*, 1997; Eberhart *et al.*, 1996; Feng, Gutekunst, *et al.*, 1997; Sittler *et al.*, 1996). Um estudo por microscopia eletrônica e imunomarcação demonstrou a presença da FMRP nos poros nucleares, consistente com a hipótese de trânsito entre núcleo e citoplasma. O mesmo grupo demonstrou que cerca de 4% da FMRP distribui-se ao núcleo celular (Feng, Gutekunst, *et al.*, 1997).

FMRP, FXR1P e FXR2P apresentam capacidade de ligação a RNA (Siomi *et al.*, 1993). As três proteínas apresentam maior afinidade por polirribonucleotídeos de guanina e uracila do que adenina e citidina (Brown *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1995). FMRP foi demonstrada como uma repressora traducional *in vitro* (Laggerbauer *et al.*, 2001) e *in vivo* (Weiler *et al.*, 2004).

Em células em cultura, foi demonstrado que FMRP, FXR1P e FXR2P distribuem-se entre polissomos e grânulos de partículas ribonucleoproteicas (RNP) (Corbin *et al.*, 1997; Feng, Absher, *et al.*, 1997; Khandjian *et al.*, 2004, 1996; Mazroui *et al.*, 2002; Weiler *et al.*, 1997). Se por um lado, estresses

celulares como oxidativos podem transferir complexos moleculares contendo a FMRP de polissomos a grânulos intracelulares (Kim *et al.*, 2006), por outro, receptores metabrotópicos ativados por glutamato acionam uma resposta intracelular que desloca grânulos de RNP com FMRP à densidade sináptica (Antar *et al.*, 2004; Aschrafi *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2007). Estudos revelaram que a FMRP é dispensável para a formação de grânulos de RNP citoplasmáticos (Gareau, Martel, *et al.*, 2013), embora sua região N-terminal seja necessária ao deslocamento dessa proteína entre os grânulos e polissomos (Gareau, Houssin, *et al.*, 2013). O transporte da FMRP em RNPs é realizado livre de polissomos e mediado por cinesinas que interagem com tubulinas (Antar *et al.*, 2005; Davidovic *et al.*, 2007; Diego Otero, De *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2004; Ohashi *et al.*, 2002; Wang, E. et al., 2008; Wang, H. et al., 2008).

Resíduos de serina e arginina, codificados pelo éxon 15 do *FMR1*, são alvos de fosforilação e metilação, respectivamente. Estas modificações pós-traducionais regulam a atividade da FMRP e a interação com RNAs e proteínas. A FMRP é alvo de metil-transferases, de forma co-traducional, e esta modificação parece ser importante para a interação com determinados RNAs endógenos e homorribopolímeros (Denman, Dolzhanskaya and Sung, 2004; Denman and Sung, 2002). A metilação não afeta a localização celular da FMRP, mas parece regular a sua capacidade de dimerização com a FXR1P, tanto *in vitro* como *in vivo* (Dolzhanskaya, Merz and Denman, 2006). O encurtamento do éxon 15 devido ao uso diferencial dos três sítios alternativos de *splicing* presentes neste éxon altera o padrão de metilação da FMRP e leva

a mudanças no perfil de interação com RNAs e proteínas (Dolzhanskaya, Merz and Aletta, 2006).

A regulação da função da FMRP no SNC está diretamente relacionada ao seu estado de fosforilação. Quando desfosforilada, a FMRP se associa a polirribossomos ativos, permitindo a tradução de seus RNAms-alvo. Entretanto, a sua fosforilação leva à inibição da atividade traducional destas mensagens (Ceman *et al.*, 2003). Demostrou-se que a fosforilação *in vivo* da FMRP ocorre no resíduo de serina localizado na posição 500, regulando sua atividade repressora traducional e sua distribuição sináptica no SNC (Coffee *et al.*, 2011). Nesta via de regulação, a FMRP é alvo da fosfatase 2A (PP2A), enquanto sua fosforilação é feita pela cinase S6K1, integrante da via de sinalização regulada pelo alvo da rapamicina em mamíferos, mTOR (Narayanan *et al.*, 2008).

A via endógena de interferência pelo RNA (RNAi) está diretamente envolvida no mecanismo da FMRP sobre a regulação traducional da expressão gênica, durante o desenvolvimento neuronal e formação sináptica. Nesta via, a transcrição de genes para microRNAs (miR) gera transcritos contendo grampos que são processados por uma endonuclease nuclear, denominada drosha, produzindo transcritos em fita dupla que são transportados ao citoplasma e, então, processados pela dicer, permitindo a desnaturação das duas fitas de RNA pelo complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC) e sua hibridação ao RNAm alvo (Collins and Cheng, 2005).

Demonstrou-se que a FMRP interage com componentes da enzima dicer, de RISC e miR, em *Drosophila* e mamíferos. Em células neuronais murinas, a FMRP interage com eIF2C2 (*Argonaute 2*), ortóloga da proteína argonauta 2 de mamíferos e parte de RISC, e se associa ao miR-125a, miR-125b e miR-132

(Edbauer *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2004). Quando fosforilada, a FMRP não mais interage com componentes de dicer (Cheever and Ceman, 2009), mas pode se associar ao complexo inibitório eIF2C2/miR-125a. Entre os alvos de miR-125ª está por exemplo PSD95 (Proteína de densidade sináptica 95) (Muddashetty *et al.*, 2011). Quando a estimulação dos receptores de glutamato (mGluR) leva à desfosforilação da FMRP, o complexo RISC-miR é liberado, permitindo a tradução do transcrito (Muddashetty *et al.*, 2011).

Corroborado pelas evidências acima, o modelo geral de função da FMRP propõe que, após a sua síntese no citoplasma, a FMRP, através do NLS, se dirija ao núcleo, onde deve interagir com seus alvos de RNAm específicos, formando RNPs (Eberhart *et al.*, 1996; Kim, Bellini and Ceman, 2009). A FMRP é então exportada para o citoplasma (Fridell *et al.*, 1996; Willemsen *et al.*, 1996), onde interage com ribossomos de forma dependente de RNA (Darnell and Fraser, 2005). No citoplasma, a FMRP reprime a expressão dos RNAms aos quais está ligada e serve como adaptadora no transporte para a região pós-sináptica, de forma dependente de microtúbulos. Mediante estímulo sináptico, ocorre mudança de seu perfil de fosforilação e a FMRP permite a tradução dos RNAms a ela associados. Este mecanismo permite a célula criar um repositório de transcritos na região pós-sináptica que podem ser prontamente traduzidos em resposta a um estímulo fisiológico (Fig. 3).

1.3 Domínios funcionais da proteína FMRP

A análise *in silico* de diferentes isoformas da FMRP geradas pelos eventos de *splicing* alternativo revelou que este pode criar diferenças nos domínios funcionais da proteína. A interação de proteínas com outras macromoléculas é regulada pela presença de domínios funcionais. Domínios

previstos para a FMRP, presentes em outras proteínas, foram demonstrados nestas como ligantes de RNA. Estes incluem dois domínios Tudor, N-terminais (codificados pelos éxons 3 e 4), dois domínios do tipo KH (homólogo à ribonucleoproteína heterogênea nuclear K, hnRNP K, codificados pelos éxons 8 a 13), centrais e um domínio rico em arginina-glicina-glicina (RGG, codificado pelo éxon 15), C-terminal (Bardoni *et al.*, 1997; Darnell *et al.*, 2001; Feng, Gutekunst, *et al.*, 1997; Maurer-Stroh *et al.*, 2003). Estes domínios, bem como os motivos de localização subcelular descritos anteriormente, são conservados nas proteínas parálogas autossômicas, FXR1P e FXR2P (Fig. 2). Por outro lado, a FMRP apresenta algumas funções não redundantes com os membros da família FXR.

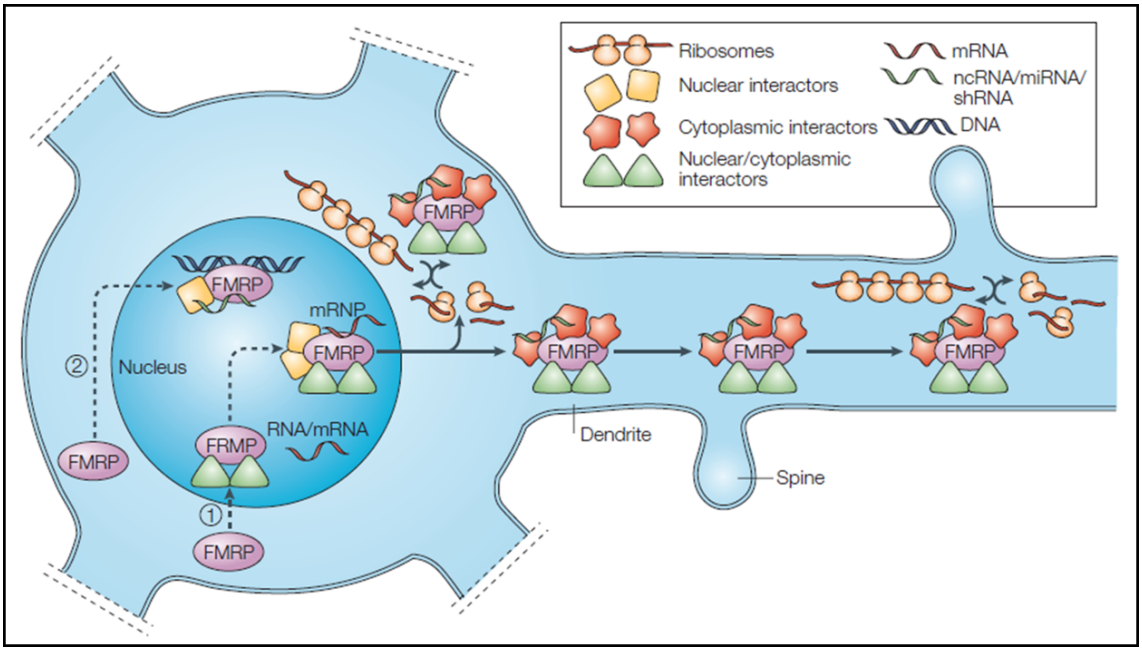

Figura 3: Esquema representando um modelo que resume as funções propostas para a proteína FMRP no neurônio. A proteína FMRP, sintetizada no citoplasma, entra no núcleo devido ao seu sinal de importação nuclear, onde interage com seus alvos de RNAm e outras proteínas. O complexo ribonucleoprotéico da FMRP sai do núcleo mediado pelo sinal de exportação nuclear da FMRP e outras proteínas. No complexo, os RNAm podem ser inativados por alterações conformacionais ou interação da FMRP com integrantes do complexo RISC. O complexo é transportado ao longo do dendrito ligado a proteínas motoras associadas ao citoesqueleto. Na região da sinapse do

neurônio pós-sináptico, os RNAm são traduzidos mediante sinalização por neurotransmissão que inibe a FMRP por fosforilação. Fonte: Bagni *et al*, 2005

1.3.1 Domínio Tudor

Adinolfi e colaboradores (1999, 2003) demonstraram que a porção N-terminal da FMRP (resíduos 1-214) possui capacidade de ligação a RNAs (Adinolfi, Bagni and Musco, 1999; Adinolfi *et al.*, 2003). Estes resíduos da FMRP compõem dois domínios da mesma espécie, denominado por Maurer-Stroh e cols (2003) como Agenet, mas que havia sido descrito em plantas e *Drosophila* como domínio Tudor (Maurer-Stroh *et al.*, 2003). Cada um desses domínios, hoje reconhecidos como Tudor (http://www.pdb.org e http://pfam.janelia.org), forma cinco folhas β definindo um módulo em barril que se emparelha com o outro, compondo o domínio N-terminal da FMRP (NDF), uma unidade estrutural com dobramento independente (Adinolfi *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2006). Embora propriedades funcionais diferentes tenham sido associadas a cada um dos dois domínios Tudor, definidos respectivamente pelos resíduos 3 a 50 e 63 a 113 da FMRP, eles têm sido considerados juntos como uma unidade funcional (Adams-Cioaba *et al.*, 2010).

Resíduos do segundo domínio Tudor são necessários para a associação com a proteína de 82 kDa que interage com a FMRP (82-FIP), que se distribui entre o núcleo celular e os polissomos citoplasmáticos (Adinolfi *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2006). Dada sua distribuição nuclear, 82-FIP é também denominada NUFIP-2 (proteína nuclear 2 que interage com a FMRP).

O RNA não codificador, citoplasmático, com expressão no cérebro, BC1 (do inglês, *brain cytoplasmic RNA1*) e seu ortólogo em primatas, BC200,

associam-se ao NDF. Neste, a região da FMRP necessária para a interação inclui o segundo domínio Tudor e estende-se além do NDF, compreendendo o segmento de 83 resíduos, imediatamente C-terminal a ele, que inclui o NLS. Em BC1/BC200, o grampo em 5' é o alvo dessa interação (Zalfa *et al.*, 2005). BC1/BC200, ao se ligar à FMRP, mascara seu NLS, impedindo a reentrada da FMRP ao núcleo celular (Zalfa *et al.*, 2003). Contendo 154 bases em *Mus musculus* e um sinal para localização em dendritos em sua extremidade 5', BC1 é transportado rapidamente aos dendritos em estudos *in vitro* (Muslimov *et al.*, 1997), embora ele não seja suficiente para o transporte de RNAms a essas estruturas (Khanam *et al.*, 2007). BC1/BC200 liga-se também à proteína ligante da cauda poliadenilada(Khanam *et al.*, 2006). Assim, BC1/BC200 poderia atuar como uma molécula adaptadora entre a FMRP e seu RNAm alvo, auxiliando a seleção de transcritos para a repressão traducional, também ocorrendo para FXR1P e FXR2P (Napoli *et al.*, 2008; Zalfa *et al.*, 2003, 2005). A modificação pós-transcricional de BC1 por metilação do oxigênio 2' da ribose diminui a afinidade pela FMRP (Lacoux *et al.*, 2012). Entretanto, a melhor elucidação dos mecanismos específicos de uma possível interação entre FMRP e o ncRNA BC1 ainda é necessária tendo em vista que diferentes grupos de pesquisa não obtiveram sucesso em reproduzir esse modelo (Iacoangeli *et al.*, 2008a; b; Yan and Denman, 2011).

1.3.2 Domínio RGG

O domínio RGG da FMRP é caracterizado por ser rico em arginina (R) e glicina (G), codificadas pelo éxon 15 do *FMR1* (resíduos 527-552). Apesar de ser parcialmente conservado nas proteínas FXR1P e FXR2P, demonstrou-se que na FMRP este domínio apresenta capacidade de ligação a estruturas

específicas de RNA denominadas quarteto em G (Darnell *et al.*, 2011; Schaeffer *et al.*, 2001). Estes quartetos permitem a ligação da FMRP ao seu próprio RNAm, sugerindo que ela possa ter um controle pós-transcricional da sua própria mensagem (Schaeffer *et al.*, 2001). O reconhecimento dos quartetos em G de RNA é altamente específico e parece ser mediado, principalmente, pelos resíduos de arginina localizados nas posições 533 e 538 da FMRP de camundongos que parecem ser relevantes também para a associação da FMRP a polirribossomos (Blackwell, Zhang and Ceman, 2010; Phan *et al.*, 2011). A ausência deste domínio altera a distribuição da FMRP aos polirribossomos, mas não impede esta ligação (Mazroui *et al.*, 2003). No cérebro, a FMRP se liga, de maneira seletiva, a um percentual significativo de RNAm (Brown *et al.*, 2001; Darnell *et al.*, 2001; Miyashiro *et al.*, 2003) e grande parte dos ligantes já descritos possuem os quartetos em G.

Um estudo utilizando sequenciamento em larga escala identificou 842 transcritos de RNAm que interagem com a FMRP no cérebro (Darnell *et al.*, 2011). Destes transcritos, 24% representavam RNAms previamente identificados como alvos da FMRP (Brown et al., 2001; Darnell et al., 2001; Miyashiro et al., 2003). Em contraste com os trabalhos anteriores, mostrou-se que 66% dos sítios de ligação da FMRP nestes mRNAs estavam localizados na região codificadora, sugerindo que não existe especificidade de sequência nesta interação (Darnell *et al.*, 2011). Uma hipótese para conciliar estes resultados é de que a FMRP poderia interagir com estes transcritos ainda no núcleo, utilizando estruturas específicas como os quartetos em G (Kim, Bellini and Ceman, 2009; Tamanini *et al.*, 1999). Uma vez transportados para o citoplasma, estes RNAms ligados a FMRP iniciariam o processo de tradução,

com a FMRP interagindo com o ribossomo e se deslocando ao longo da sequência codificadora deste mRNA (Blackwell and Ceman, 2011).

1.3.3 Domínios KH

Os domínios KH apresentam diferenças estruturais entre procariotos e eucariotos, embora ambos compartilhem a organização básica de um segmento mínimo composto por uma folha-beta, seguida por duas hélices-alfa, unidas por uma sequência conservada de quatro resíduos, e uma segunda folha-beta. Domínios KH em eucariotos contêm ainda uma alça de sequência e tamanho variáveis entre espécies, denominada alça variável, que liga o motivo central a outra folha-beta seguida de uma hélice-alfa (Brykailo, Corbett and Fridovich-Keil, 2007; Siomi *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 2007)

O domínio KH confere interações específicas a RNA e DNA de fita simples, estando presente em diversas proteínas importantes em processos de regulação gênica, como fatores de transcrição, reguladores de *splicing* e reguladores pós-transcricionais de expressão. Domínios KH são responsáveis pela ligação da proteína *Splicing factor 1* (SF1) ao ponto de ramificação nos íntrons de RNAms não processados, permitindo a ligação do restante da maquinaria do spliceossomo (Liu *et al.*, 2001). Domínios KH estão também presentes em proteínas como *Quaking*, que regula processos de diferenciação neuronal (Aberg *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007), sinalização celular e mielinização (Larocque *et al.*, 2002); e Sam68, um importante regulador de processos de *splicing* alternativo(Pedrotti *et al.*, 2010; Valacca *et al.*, 2010). Todas estas importantes reguladoras da expressão gênica compartilham entre si, além das semelhanças funcionais, alças variáveis de domínios KH com extensões similares, entre 24 e 28 resíduos. A semelhança entre seus

domínios KH classifica-as na família STAR (*signal transduction activator of RNA metabolism*), cujos membros podem apresentar de um a vários domínios KH, que cooperam para a interação com RNA e são indispensáveis para suas funções. Análises da ultraestrutura do domínio KH mostram que este apresenta duas superfícies opostas, uma com folhas-beta e outra com hélices-alfa. A interação do KH com nucleotídeos se dá na fenda hidrofóbica formada entre as duas superfícies, onde se encontra a região conservada e a alça variável se projetando externamente (Liu *et al.*, 2001; Maguire *et al.*, 2005; Staley, 2002). A região da alça variável envolve o segmento de nucleotídeos que é reconhecido pelo KH, estabilizando a interação e, portanto, é importante na função de proteínas que contêm o domínio.

A proteína FMRP possui dois domínios KH que são referidos como KH-1 e KH-2. KH-1 e formado pelos resíduos 205 ao 280 (codificados pelos éxons 8 a 9 do *FMR1*), enquanto KH-2 é constituído pelos resíduos 281 ao 422 (codificados pelos éxons 9 ao 13). O domínio KH-2 da FMRP possui a alça variável mais longa já identificada entre proteínas humanas com domínios KH. A expressão do éxon 12 do *FMR1*, que é regulada por *splicing* alternativo, pode ainda acrescentar 21 resíduos de aminoácidos à alça variável, sem mudar a moldura de leitura da tradução (Valverde *et al.*, 2007).

O domínio KH-2 é importante para as funções neuronais da FMRP. É responsável pela interação da FMRP com polirribossomos no citoplasma, como demonstrado em células em cultivo (Corbin *et al.*, 1997), *in vivo* (Feng, Absher, *et al.*, 1997) e *in vitro* (Khandjian *et al.*, 2004). Esta interação da FMRP com polirribossomos é fundamental para sua função sináptica. Sua perda resulta em alterações morfológicas e disfunções semelhantes às observadas na ausência

da FMRP (Davidovic *et al.*, 2007; Fatimy, El *et al.*, 2012; Zang *et al.*, 2009). O domínio KH-2 ainda confere a ligação da FMRP a diversos complexos ribonucleoproteicos de grande massa no citoplasma, podendo ou não estar relacionada a ribossomos (Schrier *et al.*, 2004).

Demonstrou-se que o domínio KH-2 da FMRP liga-se *in vitro* a uma estrutura secundária de RNA, os complexos em beijo (do inglês, *Kissing complex*; KcRNA). A ligação a estas estruturas de RNA impede a ligação da FMRP a polirribossomos *in vitro*, devido à competição no sítio de ligação localizado no resíduo 304, sugerindo que *in vivo* o KcRNA é o mediador entre a ligação da FMRP aos polirribossomos (Darnell and Fraser, 2005). A alça variável mais longa do KH-2 da FMRP, gerada a partir dos transcritos que incluem a sequência do éxon 12 do *FMR1*, mantém a especificidade de ligação aos RNAs contendo estruturas em complexos em beijo. No entanto, esta ligação perde a estabilidade *in vitro* rapidamente, deixando de ser detectada em um período de 24 horas, quando as outras isoformas da FMRP com alça mais curta ainda são totalmente funcionais (Darnell *et al.*, 2009). Isto sugere que a expressão do éxon 12 do *FMR1* diminua a estabilidade de todo domínio KH-2 da FMRP, fazendo com que a inclusão regulada deste éxon represente um efeito dominante negativo às interações da FMRP. É possível que formação específica de heterodímeros seja necessária à sua estabilidade.

Uma mutação no *FMR1* humano (p.I304N), que causa a substituição de uma isoleucina por uma asparagina em motivo conservado de KH-2, leva à manifestação e fenótipo grave da SXF (Boulle, Verkerk and Reyniers, 1993). O modelo animal, *knock-in* (KI), que contém esta mutação é uma fenocópia do KO do *Fmr1*, tanto em padrões comportamentais quanto morfológicos e

eletrofisiológicos (Zhang *et al.*, 2009). A análise bioquímica desta mutação mostra que interação do domínio com ácidos nucleicos perde a estabilidade (Marino and Achsel, 2013). O estudo do modelo animal, assim como da isoforma mutada *in vitro*, mostrou que a *FMRP* contendo a mutação p.I304N perde a capacidade de interagir com polirribossomos, tanto *in vitro* (Siomi *et al.*, 1994) quanto em células do modelo animal e de um paciente com mutação p.I304N espontânea (Feng, Gutekunst, *et al.*, 1997; Mazroui *et al.*, 2003). Na presença desta mutação, a FMRP não interage a ribossomos. A presença desta mutação impede ainda a interação da FMRP com os complexos ribonucleoprotéicos de grande massa com os quais ela é normalmente observada no citoplasma. Por outro lado, a mutaçãp p.I304N não interfere com o transporte ativo dependente de microtúbulos da FMRP para os neuritos. As isoformas contendo a p.I304N são observadas nos neuritos isolados (Schrier *et al.*, 2004) ou associadas a grânulos pequenos(Wang, H. *et al.*, 2008), enquanto a isoforma da FMRP tipo-selvagem pode ser observada associada a grânulos grandes contendo RNAms. A presença da mutação impede a interação da FMRP com RNAs contendo kcRNA, o que pode explicar a ausência de interação com polirribossomos (Darnell and Fraser, 2005). O modelo murino para p.I304N exibe ainda alterações na plasticidade sináptica do hipocampo durante o desenvolvimento neuronal semelhantes as observadas nas ausência da FMRP, sugerindo que estas sejam primárias no desenvolvimento da SXF, e evidenciando a importância das interações mediadas pelo KH-2 em processos fisiológicos.

Um estudo que empregou sequenciamento em larga escala para identificar RNAms que interagem com diferentes isoformas da *FMRP* detectou

transcritos de mais de 6.000 genes (Ascano *et al.*, 2012). Mais da metade destes transcritos interagiam com a FMRP principalmente em motivos conservados, identificados como ACUK e WGGA. A FMRP contendo a mutação p.I304N, neste estudo, mostrou interação com uma população de RNAms mais restrita do que a de isoformas do tipo-selvagem. Os transcritos ausentes na população de interações da FMRP mutada eram principalmente aqueles contendo a sequência conservada ACUK, indicando que este motivo deva ser um alvo do domínio KH-2 da FMRP. Foram também comparadas isoformas da FMRP que diferiam pela presença da região codificada pelo éxon 12 do *FMR1* no domínio KH-2. A população de transcritos que interagiu com a isoforma completa, que expressa esse éxon, era semelhante àquela que interagiu com a isoforma que não o expressava, mas portava a mutação p.I304N. Estes dados indicam que o aumento da alça variável no domínio KH-2 da FMRP, causado pela inclusão do éxon 12 em transcritos do *FMR1*, deva alterar o padrão de interação deste domínio com RNAm (Ascano *et al.*, 2012).

1.4 FMRP em células progenitoras

Nos últimos anos, a FMRP vem sendo estudada em modelos diferentes de células-tronco e progenitoras, permitindo a avaliação dos efeitos da ausência da FMRP durante a diferenciação neuronal. Em *Drosophila*, a perda do ortólogo do *FMR1* (*dFmr1*) causa depleção das células progenitoras, devido ao descontrole no início da diferenciação e da capacidade proliferativa, tanto na linha germinativa (Yang *et al.*, 2007) quanto em neurônios (Callan *et al.*, 2010), de forma dependente de RNAs reguladores (Yang *et al.*, 2009).

O impacto da depleção da FMRP foi também observado em células humanas progenitoras neurais (hNPCs) derivadas de cérebros fetais. Ao longo

da diferenciação neuronal, a FMRP é altamente expressa em células progenitoras comprometidas às linhagens neuronais e gliais, onde regula vários transcritos (Bhattacharyya *et al.*, 2008; Pacey and Doering, 2007). No entanto, os efeitos sobre a neurogênese ainda são um assunto controverso. As células-tronco neurais do adulto, provenientes dos ventrículos laterais, e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), sem expressão da FMRP, parecem ter mais células em diferenciação, a maioria delas com alterações morfológicas características de neurônios sem expressão do *FMR1* (Castrén *et al.*, 2005; Sheridan *et al.*, 2011). Por outro lado, as células-tronco neurais do adulto, derivadas de córtex cerebral, apresentaram proliferação e neurogênese normais. As diferenças observadas em cada modelo podem corresponder à regulação específica da FMRP em diferentes áreas cerebrais e estágios de desenvolvimento (Bhattacharyya *et al.*, 2008). Células de neonatos de dois modelos de camundongo (KO e KI do *Fmr1*) parecem acumular-se na zona subventricular em desenvolvimento do neocórtex (Castrén *et al.*, 2005; Cunningham *et al.*, 2010).

1.5 Variabilidade de tamanho da alça variável do domínio KH-2 da FMRP

A alça variável do domínio KH-2 da FMRP tem sua extensão modificada pela inclusão condicional do éxon 12 em transcritos do *FMR1*, regulada por *splicing* alternativo. A sequência do éxon 12 do *FMR1* está ausente nos genes parálogos *FXR1* e *FXR2* e em ortólogos de invertebrados (Kirkpatrick, McIlwain and Nelson, 2001) (Fig. 4).

uso de repressores da tradução, que resgatam fenótipo de perda de memória apresentado pelo modelo KO (Bolduc *et al.*, 2008) .

O primeiro mês de vida em camundongos representa o período mais importante da plasticidade sináptica. A formação dos novos circuitos é em grande parte dirigida pelos estímulos sensoriais que são apresentados logo após o nascimento. Estímulos óticos desencadeiam plasticidade no córtex cerebral em área visual dependente de sinalização glutamatérgica (Fagiolini and Hensch, 2000; Hensch *et al.*, 1998), enquanto estímulos tácteis iniciam a formação de circuitos no córtex somatosensorial antes mesmo da abertura dos olhos (Hensch, 2005; Sadaka *et al.*, 2003), estímulos sonoros ativam a área auditiva cortical (Villers-Sidani, de *et al.*, 2007), bem como aqueles olfativos alcançando o córtex piriforme (Larson *et al.*, 2005). Estímulos motores atingem o córtex motor, bem como o cerebelo (Hoellinger *et al.*, 2013).

As vesículas telencefálicas em E14 são sítio de neurogênese ativa no embrião do rato (Saffary and Xie, 2011). Nestas, os níveis da expressão do éxon 12 nos transcritos do *Fmr1*, aferidos por qRT-PCR, mantiveram-se estatisticamente semelhante aos níveis em córtex cerebral em E19, os quais, em estudo anterior, mostraram-se significativamente inferiores aos da mesma estrutura em P2 (Anexo 1). Ao nível proteico, as $FMRP_{+12}$ISO mostraram-se mais elevadas entre E16 e E20 do que entre E12 e E14 (Fig. 26). Estes dados correlacionaram-se aos de imunoistoquímica de embriões com a mesma idade gestacional (Fig. 27). Por outro lado, quando se observa o encéfalo de rato em P12, a marcação com ambos, o anticorpo 7G1-1 ou soro imune 3460, torna-se bem mais evidente e frequente, sobretudo no córtex cerebral (Figs. 6 a 22). De fato, foi relatado por diferentes grupos que, ao longo das duas primeiras

semanas pós-natais em ratos, as expressões do RNAm do *FMR1* e da proteína FMRP se elevam (Akins *et al.*, 2012; Christie *et al.*, 2009; Irwin *et al.*, 2000, 2005; Todd and Mack, 2000; Todd, Malter and Mack, 2003), de forma concordante com o período em que a sinaptogênese e a plasticidade neuronal se encontram em seu ápice (Fiala and Feinberg, 1998; Harris, Jensen and Tsao, 1992). A expressão da FMRP aumenta no córtex occipital após exposição do animal a ambientes complexos por 20 dias a partir de 30 dias de idade (Irwin *et al.*, 2005); no córtex somatosensorial, após estimulação de vibrissas com um pincel por 15 minutos (Todd and Mack, 2000; Todd, Malter and Mack, 2003); em espinhas dendríticas em resposta à função sináptica glutamatérgica (Weiler *et al.*, 1997). Este perfil de expressão gênica relaciona-se ao período crítico para a sinaptogênese. No caso da estimulação do córtex sensorial, como relatado, o aumento da expressão da FMRP é dependente da tradução e não da transcrição do gene (Todd, Malter and Mack, 2003).

O nascimento define o início de um período crítico, quando propriedades neuronais são particularmente suscetíveis à modificação pela experiência. Este período crítico de sensibilidade mais generalizada descreve um intervalo no qual a presença de estímulos específicos internos e externos são necessários para o desenvolvimento normal do cérebro. Períodos críticos são caracterizados por competição funcional entre estímulos (genéticos e ambientais) e modificações estruturais como desenvolvimento e maturação de espinhas dendriticas. Períodos críticos têm início e duração específicos para cada sistema. Mesmo dentro do córtex cerebral, áreas altamente especializadas como o córtex visual, o córtex auditivo e o córtex neurosensorial

têm janelas distintas dentro do desenvolvimento pós-natal, criticas para promover a plasticidade sináptica.

Assim, nove facetas do período crítico podem ser distinguidas: (i) competição funcional entre estímulos genéticos e ambientais; (ii) a atividade elétrica tem um papel particular, sendo a maioria dos modelos celulares de plasticidade baseados na habilidade de potencializar ou reprimir a transmissão em sinapses individuais através de seus padrões de ativação; (iii) um período crítico pode ser definido por seus sistemas onde modificações estruturais se tornam essencialmente irreversíveis além de certa idade; (iv) a continuação do crescimento mantém a sensibilidade à influencia do ambiente durante toda a vida; (v) o início e duração de um período crítico são definidos não apenas pela idade, mas pela experiência; (vi) períodos críticos têm tempo de início e duração únicos para cada sistema; (vii) há uma diversidade de mecanismos moleculares nos diferentes sistemas ou até mesmo estágios da mesma via; (viii) circuitos inibitórios exercem um papel especial no sistema nervoso central; (ix) atenção e motivação (excitação) têm poderosa influência nos períodos críticos.

A regulação da função da FMRP, no SNC, está também diretamente relacionada ao seu estado de fosforilação. Quando desfosforilada, a FMRP se associa a polirribossomos ativos, permitindo a tradução de seus RNAms-alvo. Por outro lado, a sua fosforilação leva à inibição da atividade traducional destas mensagens (Ceman *et al.*, 2003). Nesta via de regulação, a FMRP é alvo da fosfatase 2A (PP2A) (Narayanan *et al.*, 2007), enquanto sua fosforilação é feita pela kinase S6K1, integrante da via de sinalização regulada pelo mTOR (Narayanan *et al.*, 2008). A ativação de receptores glutamatérgicos causa

desfosforilação e degradação da FMRP na região pós-sinaptica, permitindo a tradução dos transcritos alvo da FMRP. Esta maior taxa de tradução induz a internalização dos receptores AMPA e LTD. A redução de receptores AMPA da superfície celular causa uma inabilidade de a espinha responder a estímulos sinápticos, interferindo na sua maturação morfo-funcional e resultando no fenótipo dismórfico observado em pacientes com SXF e animais KO.

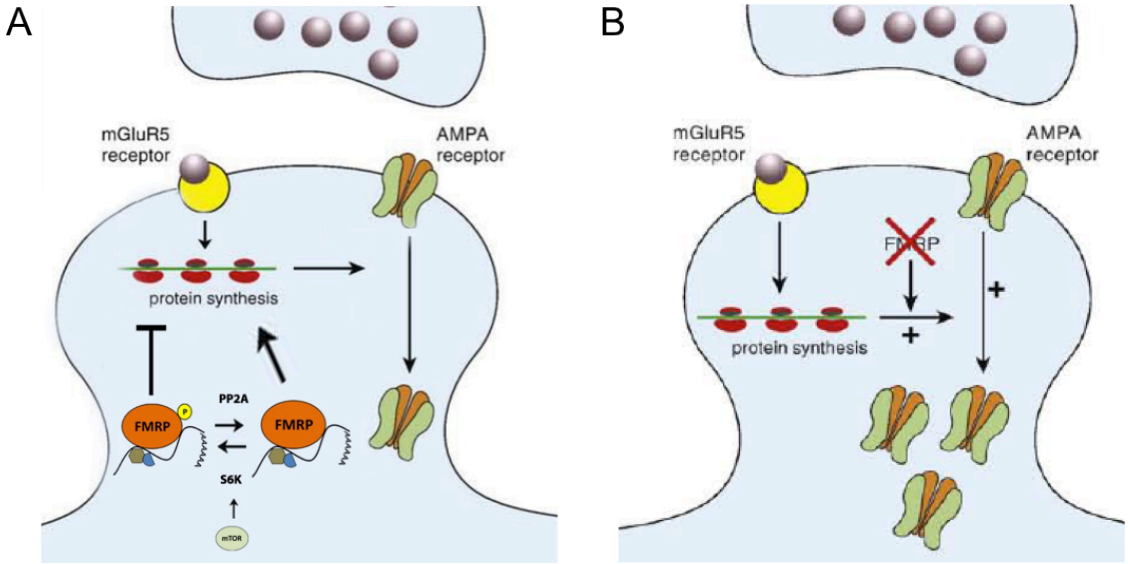

Figura 39: Esquema demostrando a regulação por fosforilação da FMRP na repressão traducional. **(A)** Na espinha dendrítica , a fosforilação da FMRP pela quinase S6K leva a inibição da síntese proteica e mantém os níveis de internalização dos receptores do tipo AMPA . A desfosforilação da FMRP pela fosfatase PP2A permite o aumento dos níveis de síntese proteica. **(B)** Na ausência de FMRP não há repressão traducional levando ao aumento dos níveis de síntese proteica e internalização dos receptores do tipo AMPA, caracterizando o processo de LTD. Fonte: Modificado de de Oostra & Willemsen, 2008

De fato, estudos de plasticidade sináptica revelaram algumas das estratégias utilizadas para alterar a função sináptica em diversas regiões do cérebro. A plasticidade comportamental requer alterações sinápticas

dependentes de atividade na organização de neurônios interconectados. Estas mudanças de circuitos são a base não apenas do aprendizado e formação de memória e outras formas de plasticidade, mas também de algumas patologias como a SXF e outras deficiências intelectuais. Atividade sináptica que induz LTP pode deflagrar respostas pós-sinápticas mediadas por receptores AMPA. O aparecimento de respostas mediadas por receptores AMPA ocorre provavelmente pela inserção destes na membrana pós-sináptica. Seguindo a adição de novos receptores AMPA, a resposta da célula pós-sináptica a sinais glutamatérgicos deve aumentar. De fato, tal aumento é uma possível explicação para o fortalecimento da transmissão sináptica durante a LTP. Inversamente, a depressão ao longo prazo (LTD) da transmissão sináptica é comumente associada com a perda de receptores AMPA na membrana pós-sináptica, provavelmente devido à internalização desses receptores na célula pós-sináptica. Portanto, neurônios podem fortalecer ou reprimir a transmissão sináptica regulando o número de receptores AMPA na membrana pós-sináptica. Tais alterações na eficiência sináptica são importantes na LTP e LTD, assim como na maturação de sinapses glutamatérgicas.

Se as sinapses continuarem a aumentar em potência, como resultado da LTP, elas poderiam atingir eventualmente um máximo de eficiência, tornando difícil a codificação de novas informações. Desta forma, para tornar o reforço sináptico útil, outros processos devem seletivamente enfraquecer grupos específicos de sinapses. A LTD é este processo. LTP e LTD requerem ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA e resultam na entrada de Ca^{+2} na célula pós-sináptica. O maior determinante para o desenvolvimento de LTP ou LTD parece ser a quantidade de Ca^{+2} na célula pós-sináptica. Um incremento

pequeno no Ca^{+2} leva à depressão, enquanto doses maiores desencadeiam a potencialização. LTP é parcialmente devida à ativação de CaMKII, que fosforila proteínas-alvo. LTD, por outro lado, parece resultar da ativação de fosfatases dependentes de Ca^{+2}. Os diferentes efeitos do Ca^{+2} durante a LTP ou LTD podem surgir da ativação seletiva de cinases ou fosfatases pelos altos ou baixos níveis de Ca^{+2}, respectivamente. É possível que haja fosforilação e desfosforilação do mesmo conjunto de proteínas regulatórias, respectivamente na LTP e LTD, a fim de controlar a eficiência da transmissão sináptica. A relação de FMRP na regulação desses mecanismosatraves de síntese protéica está diretamente relacionada ao aumento de sua expressão logo após o nascimento do animal.

5.2 A FMRP e o córtex cerebral

À IHQ, o soro imune 3460 apresentou um padrão de marcação no córtex cerebral com sinal restrito às camadas corticais I (camada molecular), II (camada granular externa) e III (camada piramidal externa), algumas vezes chegando à região superficial da camada IV (camada granular interna). Na região mais rostral do encéfalo do rato, a primeira região cortical onde identificamos sinal com o soro imune 3460 foi no córtex motor, inicialmente no córtex motor primário e a partir de regiões pouco mais caudais no córtex motor secundário. A presença da FMRP no córtex motor já foi descrita anteriormente e é condizente com sinais apresentados pelos animais KO e pacientes afetados pelas síndromes relacionadas a FMRP, SXF e FXTAS, que mostram a habilidade motora diminuída na ausência da FMRP. Pacientes com a SXF exibem comportamentos estereotipados típicos do autismo, assim como atraso no desenvolvimento do controle motor fino (Largo and Schinzel, 1985; Roberts

et al., 2009; Zingerevich et al., 2009). Estes sintomas motores começam a se apresentar na infância (Baranek *et al.*, 2008a). Além disso, pacientes com SXF exibem dificuldade de coordenação motora em idades mais avançadas (Kau, Meyer and Kaufmann, 2002). Camundongos KO para o *Fmr1* exibem alterações temporais em comportamento oromotor (Roy *et al.*, 2011). No córtex motor, a FMRP foi observada como integrante de grânulos ribonucleoproteicos (RNP) citoplasmáticos, os quais são imprescindíveis para que a FMRP exerça suas atividades de regulação traducional e transporte de RNP (Barbee *et al.*, 2006; Fatimy, El *et al.*, 2012). A FMRP é uma integrante crucial destes grânulos, sem a qual a sua regulação é perdida (Christie *et al.*, 2009). Os grânulos contendo FMRP apresentaram padrões de expressão pré e pós-sinápticos, sugerindo que, além das funções pós-sinápticas mais bem estabelecidas, a FMRP deva ter um papel na regulação pré-sináptica (Suvrathan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009). Atuando nestes dois compartimentos, a FMRP deve estar intimamente relacionada com a formação de circuitos que controlam atividades motoras. Além do córtex motor, estes grânulos estão também enriquecidos em outras regiões relacionadas ao controle motor como cerebelo, formação reticular e tálamo (Christie *et al.*, 2009) (Akins *et al.*, 2012). A distribuição destes grânulos foi estudada em animais juvenis (P15), com idades próximas às dos que compuseram nosso estudo (P12), período do desenvolvimento em que se encontram no pico da sinaptogênese e plasticidade neuronal (Fiala and Feinberg, 1998; Harris, Jensen and Tsao, 1992). Após esse período, a expressão da FMRP diminui rapidamente, tendo expressão muito baixa em animais senis (P60) (Christie *et al.*, 2009).

Além das áreas de planejamento motor, os grânulos contendo FMRP se encontram enriquecidos em estruturas responsáveis pelo processamento de sinais sensoriais (Akins *et al.*, 2012). Nossas observações no córtex cerebral mostraram intensa marcação com o soro imune 3460 em regiões do córtex somatossensorial, córtex visual e córtex auditivo, indicando a presença das isoformas $FMRP_{+12}ISO$ nas regiões de processamento sensorial. A ausência da FMRP leva a alterações sensoriais tanto em humanos quanto em camundongos. Pacientes afetados pela SXF apresentam hipersensibilidade a estímulo sensorial, enquanto animais KO podem ter convulsões quando expostos a estímulo auditivo intenso (Baranek *et al.*, 2008b; Chen and Toth, 2001; Miller *et al.*, 1999). Outros estudos também mostraram expressão alta dos grânulos contendo FMRP em sistemas somatosensoriais (Price, Verne and Schwartz, 2006) e mais especificamente no córtex visual (Christie *et al.*, 2009). A FMRP apresenta expressão alta em regiões importantes no processamento auditivo ao longo do tronco encefálico, tálamo e formação reticular (Akins *et al.*, 2012). Nestas regiões, a FMRP também se associa com canais de potássio na região pre-sináptica, importantes na sinalização que codifica estes sinais (Brown *et al.*, 2010).

Mostramos com o soro imune 3460 marcação em diversas seções do córtex cingulado, com a mesma distribuição que o sinal para o anticorpo 7G1-1. A disfunção nesta região causada pela ausência da expressão da FMRP e suas isoformas $FMRP_{+12}ISO$ é condizente com os fenótipos sensoriais apresentados pelos pacientes SXF e modelos animais KO e KI. O córtex cingulado é uma região importante na formação de memória e recebe estímulo de regiões sensoriais, tendo sido implicado na formação de memória olfativa

reforçada por correlação emocional (Matsunaga *et al.*, 2013) e na coordenação auditivo-motora (Pecenka, Engel and Keller, 2013). Mostramos que as isoformas $FMRP_{+12}ISO$ se expressam nos animais em P12 em diversas áreas relacionadas ao processamento sensorial, sugerindo uma possível função da alça variável mais longa de KH-2 nestes processos. Paralelamente, mostramos que a FMRP tem um aumento de expressão no início do período pós-natal, fase em que foi demonstrado que a FMRP tem sua expressão aumentada em resposta a grande riqueza de estímulos apresentados e a formação de processos cognitivos (Gabel *et al.*, 2004; Irwin *et al.*, 2005; Todd and Mack, 2000).

Em animais em P15, a FMRP foi observada no córtex cerebral se estendendo da camada I a camada IV do córtex cerebral, muitas vezes em segmentos esparsos, mas com marcação muito forte no hipocampo. Neste estudo, a ausência da FMRP causou defeitos de maturação e proliferação neuronal e dismorfismo de espinhas dendríticas, especificamente no córtex cerebral somatosensorial primário (Till *et al.*, 2012). Embora a maturação neuronal ainda tenha ocorrido no córtex somatosensorial, sua capacidade de formar circuitos sinápticos foi perdida, o que foi atribuído à redução da plasticidade neuronal.

Em contraste com nossas observações, Till e colaboradores (Till *et al.*, 2012) não observaram nenhuma marcação em células da glia. Enquanto a IHQ não permite uma discriminação inequívoca entre células neuronais ou gliais, a maioria das nossas observações ao microscópio em regiões corticais e hipocampais mostrou células com morfologia indicativa de neurônios, enquanto

na região do corpo caloso, observamos marcação que é sugestiva de expressão da FMRP e $FMRP_{+12}$ISO nas fibras de oligodendrócitos (dados não mostrados), que deve ser um achado inespecífico. Nas regiões dos ventrículos laterais observamos ainda marcação exclusiva para o anticorpo 7G1-1 no epêndima, epitélio cuboide simples, e plexo coroide, que representa uma continuação deste epitélio, sobre uma lâmina basal, altamente vascularizada que se projeta à luz dos ventrículos (Fig. 12). Essas marcações são reminiscentes da expressão da FMRP em outros tecidos epiteliais, bem como da possibilidade de marcação de célula epitelial da meninge, como descrito (Fig. 6). Descreveu-se a expressão da FMRP em células da glia (Mientjes *et al.*, 2006; Pacey and Doering, 2007) e que transcritos de origem glial podem ser transportados ativamente para neurônios (Giuditta *et al.*, 2008), levantando-se a dúvida sobre a origem dos transcritos que traduzem para a FMRP encontrada em neurônios. Em estudo recente investigou-se a questão, demonstrando-se que a FMRP detectada na região pré-sinaptica é de fato de origem neuronal (Akins *et al.*, 2012; Till *et al.*, 2012) e que o aumento da síntese proteica advindo da ausência da FMRP no modelo KO é mais acentuada em áreas com maior densidade neuronal (Qin *et al.*, 2005).

Nossas observações sobre a presença da FMRP (E18 a E20) e $FMRP_{+12}$ISO (E20) na camada mais superficial da placa cortical de forma uniforme, levou-nos a indagar se células do tipo Cajal-Retzius poderiam expressar a FMRP, aspecto não relatado na literatura científica. No entanto, as condições para estudos morfológicos empregadas no presente estudo são insatisfatórias para esclarecer esta questão. Para tal, a marcação dupla com anticorpo anti-reelina ou a imunomarcação com ouro e observação à

microscopia eletrônica de neurônios bipolares ou multipolares na camada I seria necessário. A reelina (RELN) é uma glicoproteína muito importante no SNC, tanto no desenvolvimento, quanto na vida adulta. Diversas doenças neuropsiquiátricas compartilham uma desregulação no gene *RELN* como autismo, mal de Alzheimer (Botella-López *et al.*, 2006), esquizofrenia (Geyer *et al.*, 1999; McAlonan *et al.*, 2002; Turetsky *et al.*, 2007). Esta proteína é normalmente expressa durante o desenvolvimento em celulas de Cajal-Retzius temporárias da camada I do córtex cerebral, além do hipocampo, córtex entorrinal e cerebelo no adulto (Abraham and Meyer, 2003; Alcántara *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 2007; Doehner and Knuesel, 2010; Lacor *et al.*, 2000). A reelina atua na manutenção da plasticidade sináptica através de receptores NMDA (Beffert *et al.*, 2005; Groc *et al.*, 2007; Herz and Chen, 2006; Qiu and Weeber, 2007; Ventruti *et al.*, 2011). Transcritos do gene *RELN* foram identificados como alvo da regulação pela proteína FMRP (Darnell *et al.*, 2011). FMRP tem expressão baixa em neurônios de pacientes com diversos transtornos psiquiátricos como autismo (Fatemi, Folsom and Thuras, 2011; Fatemi and Folsom, 2010, 2011) esquizofrenia e transtorno bipolar (Fatemi *et al.*, 2010). A ausência da repressão traducional da FMRP sobre *RELN* pode ser um dos mecanismos importantes na patologia da SXF e de condições psiquiátricas. Neste caso, a marcação dupla com o anticorpo anti-reelina e anti-FMRP será importante para esclarecer esta questão.

5.3 A FMRP e o cerebelo

O cerebelo é uma importante estrutura nas patologias SXF e, principalmente, FXTAS, visto que pacientes apresentam importantes sintomas motores, além de sinais à ressonância magnética do crânio em FXTAS (Berry-

Kravis *et al.*, 2007). Os estudos de localização de transcritos do gene *FMR1* humano identificaram diversas variantes destes RNAms no cerebelo, principalmente células de Purkinje (Abitbol *et al.*, 1993). Ao nível proteico, os grânulos de RNP contendo FMRP foram observados por todo o cerebelo, com maior expressão na camada molecular superficial e vermis. (Akins *et al.*, 2012; Devys *et al.*, 1993). Estes grânulos foram também observados no cerebelo de animais em P15, estendendo-se até a camada granular externa (Christie *et al.*, 2009), uma região onde novos neurônios estão se diferenciando e formando sinapses (Landis, 1987). Os grânulos com FMRP são observados em projeções de células de Purkinje em idades a partir de P6 até P20. A marcação em todo o cerebelo desaparece de P30 a P60 (Christie *et al.*, 2009). O soro imune 3460 apresentou sinal positivo para os animais em P12 no cerebelo, nas células de Purkinje e camada granular, além de sugestiva marcação na camada molecular (a mais externa). Além de recorrentes observações de expressão da FMRP nas células de Purkinje (Mientjes *et al.*, 2006), estas apresentam espinhas dendriticas alongadas e indução de LTD aumentada em estudos eletrofisiológicos e de comportamento nos KO. As alterações motoras, causadas pela ausência da FMRP foram ainda demonstradas no modelo condicional de KO do *Fmr1*, cuja deleção estava restrita às células de Purkinje. Estes animais apresentaram déficit em testes de condicionamento de piscar olhos (Koekkoek *et al.*, 2005). A marcação com o anticorpo 7G1-1 em nosso estudo acompanhou padrão semelhante ao apresentado pelo soro imune 3460, embora com intensidade mais alta na camada granular do que em células de Purkinje. Porém, o forte sinal visto nessas células pelo soro imune 3460 pode

ser, em parte, decorrente de clones de anticorpos presentes no soro pré-imune (Fig. 19).

5.4 A FMRP e o hipocampo

A plasticidade sináptica do hipocampo é crucial para mecanismos de aprendizado e memória, potencializando ou reprimindo sinais sinápticos (Armano *et al.*, 2000; Beggs, 2001). Em roedores, o hipocampo se forma por volta do décimo quinto dia embrionário (E15), inicialmente por interneurônios produtores de GABA e, em seguida, pela gênese dos neurônios piramidais glutamatérgicos no hipocampo (Soriano, Cobas and Fairén, 1986). Estes dois tipos celulares tem origens distintas. Progenitoes de neurônios GABAérgicos têm origem na eminência gangliônica medial e migram tangencialmente no curso migratório hipocampal para formar o neuroepitélio denteado(Pleasure, Collins and Lowenstein, 2000). Neurônios glutamatérgicos têm origem no neuroepitélio de Ammon e migram por curtas distâncias radialmente para formar as camadas piramidais do hipocampo (Altman & Bayer, 1990).

No desenvolvimento, a última estrutura hipocampal a ser formada é o giro denteado. Esta é uma região de muito interesse por formar novos neurônios durante a idade adulta. No embrião, progenitores de neurônios granulares expressando o marcador pro-neurogênico mash-1, migram ao giro denteado em desenvolvimento por volta de E18 (Pleasure, Collins and Lowenstein, 2000). Esta corrente migratória coloniza a matriz terciária e a camada granular na embriogênese tardia e principalmente no período pós-natal precoce. De fato, a maioria dos neurônios no giro denteado de roedores aparece no período pós-natal (Altman and Das, 1965; Bayer and Altman, 1991) com o período de pico da gênese de células granulares ocorrendo entre cinco e

sete dias depois do nascimento do rato (Schlessinger, Cowan and Gottlieb, 1975). Neurônios granulares surgem de progenitores que inicialmente residem em uma zona proliferativa ectópica no hilo denteado, que progressivamente retrai e origina a camada subgranular do giro denteado (Altman and Das, 1965; Bayer and Altman, 1991).

Diversos estudos sugerem que receptores ionotrópicos $GABA_A$, NMDA e AMPA apresentam uma participação sequencial na excitação neuronal durante a formação sináptica (Ben-Ari *et al.*, 1989; Garaschuk, Hanse and Konnerth, 1998). No hipocampo neonatal, assim como em outras estruturas cerebrais imaturas, GABA, o principal transmissor de sinais inibitórios no sistemas nervoso central adulto, provê a maior parte dos sinais excitatórios (Cherubini, Gaiarsa and Ben-Ari, 1991; Leinekugel *et al.*, 1997). A mudança de despolarização para hiperpolarização pela ação de GABA é mediada pela variação de concentração interna de Cl^- (Owens and Kriegstein, 2002; Rivera *et al.*, 1999), a qual ocorre no hipocampo no final da primeira semana pós natal do rato (Ben-Ari *et al.*, 1989).

O desenvolvimento da transmissão sináptica glutamatérgica é caracterizado pela participação precoce de receptores NMDA e depois AMPA. Portanto, no hipocampo em P1-P2, estímulos elétricos evocam em células piramidais uma corrente pós-sináptica bloqueada apenas por antagonistas de receptores NMDA (Ben-Ari *et al.*, 1989; Duran *et al.*, 1995). Devido ao bloqueio de canais NMDA por Mg^{+2} de forma dependente de voltagem, essas sinapses são silenciosas em potenciais de membrana de repouso. Estudos com microscopia eletrônica forneceram evidências diretas de que, após o nascimento, sinapses glutamatérgicas têm uma maioria de receptores NMDA

(Petralia *et al.*, 1999). O percentual de sinapses silenciosas diminui durante o desenvolvimento com progressiva colocalização de receptores AMPA e NMDA para o sítio sináptico (Duran *et al.*, 1995; Hsia, Malenka and Nicoll, 1998; Petralia *et al.*, 1999), como explicado anteriormene para a maturação sináptica com formação de LTP e LTD.

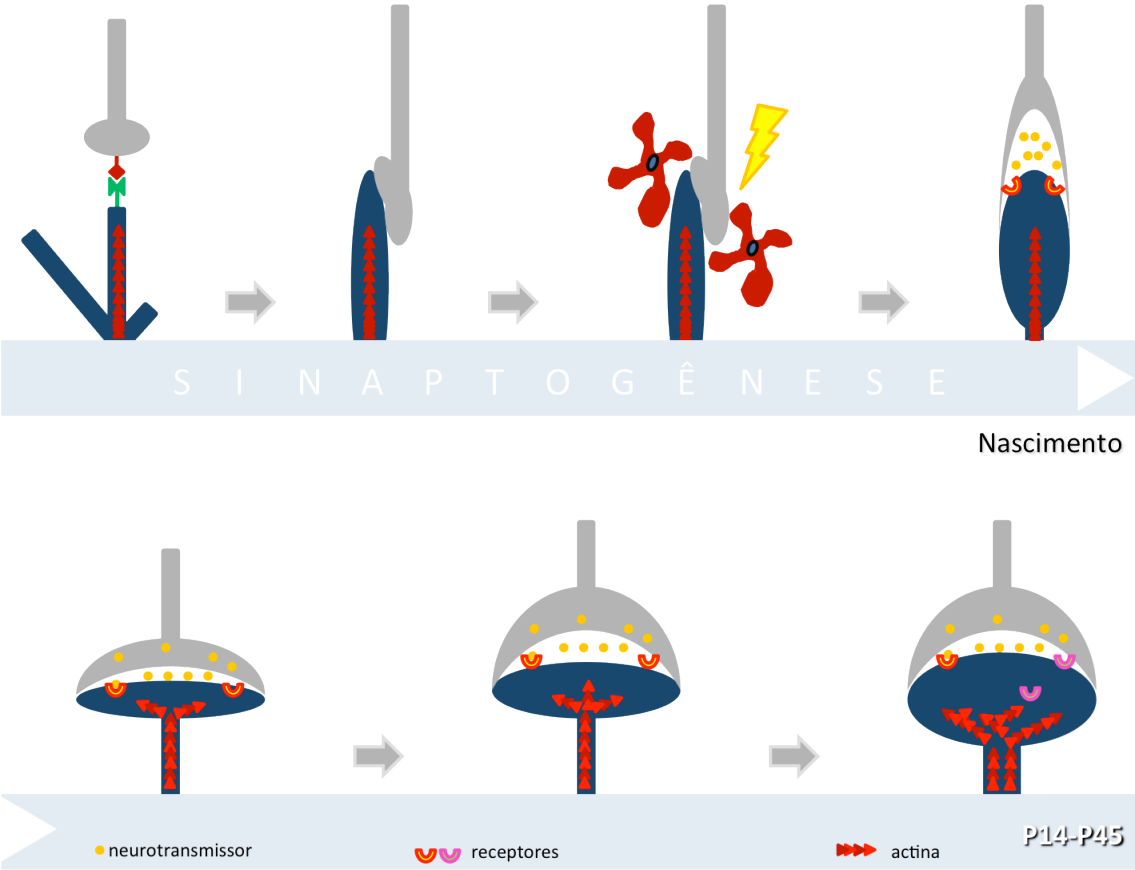

Figura 40: Esquema demostrando a maturação das espinhas dendríticas e a formação de sinapses. A formação sináptica inicia-se com o encontro de dois neurônios através de interações heterotípicas entre moléculas de adesão. Com isso, ha formação de filopódios e uma reestruturação do citoesqueleto para se estabelecer o contato entre 2 celulas. As primeiras sinapses são elétricas e se dão provavelmente pelo auxilio de =outras celulas como gliais e formação de junções do tipo fenda. A partir do momento que as celulas se tornam excitáveis, as sinapses com neurotransmissor são inicialmente GABAergicas, porem excitatórias, ate o nascimento do animal em que ha uma inversão com a concentração de cloretos. A partir dai, ha a expressão dos receptores glutamatergicos NMDA e se observa maior remodelamento do citoesqueleto de actina. As protuberâncias da membrana do dendrito do neurônio pós-sináptico já se mostram mais volumosas, com formato de espinhos ou cogumelo. A LTP já esta presente. A maturação sinaptica só acontecera após a expressão de

receptores do tipo AMPA, também inotrópicos, cuja internalização irá culminar com o aparecimento da LTD e eliminação sinaptica.

A função de regulação da tradução de alvos de RNAm pela FMRP está intimamente relacionada a sua capacidade de interagir com grânulos ribonucleoproteicos (RNP) nos quais estes transcritos estão sendo reprimidos. Em animais em P15, apesar de a FMRP isolada ser identificada em todas as regiões do hipocampo, a presença destes grânulos contendo FMRP foi detectada apenas no giro denteado e área CA3 do hipocampo, especificamente na região sináptica (Christie *et al.*, 2009). A deleção do *Fmr1* especificamente em células destas áreas causou aumento no número destes grânulos, sugerindo que a FMRP é importante na regulação, mas não na localização destes complexos (Akins *et al.*, 2012). Em animais senis (P60), a expressão da FMRP nessas áreas tornou-se desprezível (Christie *et al.*, 2009) (Akins *et al.*, 2012).

Nossas observações em ratos P12 da expressão da $FMRP_{+12}$ISO no giro denteado e CA3 do hipocampo são concordantes com os relatos anteriores para a FMRP. Como relatado, há neurogênese no giro denteado no período pós-natal precoce. A expressão das $FMRP_{+12}$ISO neste local e período pode se relacionar a alguma etapa importante da diferenciação neuronal, antes do amadurecimento sináptico. Tanto o anticorpo 7G1-1 quanto o soro imune 3460 apresentarou sinal no hipocampo, que foi mais intenso no giro denteado e área CA3, podendo ser observado também na fímbria do hipocampo e nas adjacências no córtex parahipocampal com o anticorpo 7G1-1 (Figs. 17 e 21). Esta distribuição sugere que as isoformas $FMRP_{+12}$ISO podem ter um papel nas funções de memória e aprendizado, exercidas também pelas demais

isoformas da FMRP no hipocampo. A presença da FMRP e de suas isoformas $FMRP_{+12}ISO$ na área CA3 do hipocampo é coerente com a observação de que a FMRP está expressa na formação reticular, região que regula sinais de diversas fontes sensoriais, inclusive de dor (Mason, 2001). Como já mostramos, as isoformas da FMRP, que expressam ou não a sequência do éxon 12, estão presentes em áreas do córtex sensorial. Estes e vários outros estudos indicam que a FMRP participa da transmissão sensorial de diversas modalidades de estímulos. Estes estímulos passam em enervações pelo septo lateral, no núcleo septal, ligando as regiões de processamento sensorial à área CA3 do hipocampo. Estas enervações ligam a região CA3 ao córtex piriforme responsável pela discriminação olfativa (Staubli and Lynch, 1987). A região do córtex piriforme tem resposta sináptica mediada por receptores NMDA, que se encontra alterada nos animais *Fmr1* KO (Gocel and Larson, 2012). Estes mesmos animais apresentam ainda um déficit no LTP, específico no córtex piriforme (Larson *et al.*, 2005). Nosso estudo com o soro imune 3460 mostrou um sinal intenso no córtex piriforme e no núcleo endopiriforme em diferentes coordenadas estereotáxicas, sempre acompanhado de marcação com o anticorpo 7G1-1 (Figs. 14 e 15). Estas marcações reforçam a hipótese de que as isoformas $FMRP_{+12}ISO$ podem exercer funções específicas durante o processamento sensorial relacionado a diversos estímulos.

5.5 A FMRP e células-tronco neurais pós-natais

Detectamos com o soro imune 3460 e anticorpo 7G1-1 marcação na região periventricular em P12 de ambos os ventrículos laterais em porção mais rostral, com distribuição tanto dorsal quanto ventral. A região periventricular é uma das poucas áreas no encéfalo onde ocorre neurogênese durante a fase

adulta (Pencea *et al.*, 2001; Tervonen, T. A. *et al.*, 2009). De forma semelhante, encontramos sinal com o soro imune 3460 e 7G1-1 no giro denteado do hipocampo e na camada granular externa do cerebelo (Fig.17), regiões do encéfalo que são neurogênicas durante a fase adulta (Landis, 1987). Além dessas, neurogênese foi também documentada no animal adulto no bulbo olfatório (Lötsch *et al.*, 2013), embora esta estrutura não tenha sido analisada no presente estudo. A FMRP é importante no processo de diferenciação de células progenitoras neuronais, tanto na linhagem germinativa (Yang *et al.*, 2007) quanto em células progenitoras pós-natais em cérebro de *Drosophila* (Callan *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2010) e na região subventricular de camundongos (Scotto-Lomassese *et al.*, 2011). Células de camundongos neonatos KO para o *Fmr1* parecem acumular-se na zona subventricular em desenvolvimento do neocórtex (Tervonen, T. a *et al.*, 2009). Em modelos celulares com abolição da expressão da FMRP, células-tronco neurais do adulto, provenientes dos ventrículos laterais e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) apresentam um aumento no número de células em diferenciação, a maioria destas com alterações morfológicas características de neurônios dos modelos KO do *Fmr1* (Castrén *et al.*, 2005; Sheridan *et al.*, 2011). Por outro lado, em células-tronco neurais do adulto (P28) derivadas de córtex cerebral, a proliferação celular e a neurogênese encontram-se normais (Galvez and Greenough, 2005b). Esta diferença pode ser atribuída à menor expressão da FMRP no córtex cerebral do adulto (Bhattacharyya *et al.*, 2008), sugerindo que a função da FMRP nos progenitores neuronais seja mais importante no período crítico para a sinaptogênese, no fim da segunda semana

de vida. Nossos dados sugerem que as isoformas $FMRP_{+12}ISO$ podem ter um papel em ambos os processos.

Para averiguar mais especificamente a função das isoformas $FMRP_{+12}ISO$ nos progenitores neuronais, estabelecemos culturas de neuroesferas que foram diferenciadas em cultivo. Confirmamos que a expressão da FMRP nestas progenitoras é bastante elevada (FIG. 33, B) e mostramos que a expressão das isoformas $FMRP_{+12}ISO$ é muito baixa nestes progenitores em seu estado indiferenciado. Entretanto, durante o processo de diferenciação neuronal, a expressão destas isoformas aumenta rapidamente, se tornando equiparável ao das isoformas mais abundantes da FMRP (FIG. 33, B). Nossos dados sugerem que as isoformas com a alça variável em configuração mais longa no KH-2 da FMRP tem sua função regulada e exercem uma função específica, ainda desconhecida, durante a diferenciação neuronal.

No embrião, a proliferação de células precursoras e a diferenciação e migração de novos neurônios e células da glia são essenciais para o estabelecimento da arquitetura cortical (Costa *et al.*, 2009). Durante a embriogênese, a FMRP é altamente expressa em regiões que contêm células progenitoras e neurônios recém-diferenciados (Castrén *et al.*, 2005; Schrier *et al.*, 2004). Embora a ausência da FMRP pareça não afetar a proliferação de progenitores, estudos de células-tronco neuronais em cultura sugerem que a ausência desta proteína leva ao aumento da produção de células expressando marcadores neuronais (Castrén *et al.*, 2005).

5.6 A FMRP no envelhecimento cerebral

Não observamos expressão significativa do éxon 12 do *FMR1* humano em córtex cerebral frontal, humano, em envelhecimento. Nas mesmas amostras, a expressão dos íntrons 1, 7 e 15 foi desprezível. Desta forma, concluímos não haver retenção intrônica nessas amostras, bem como não ser relevante a contribuição da configuração longa da alça variável ao domínio KH2 da FMRP em córtex cerebral, frontal, humano, em envelhecimento saudável.

Pacientes com FXTAS e camundongos k*nock-in* (KI), cuja curta sequência de trinucleotídeos CGG foi substituída por trato repetitivo CGG do tamanho de pré-mutações na região 5'-UTR do *Fmr1*, apresentam inclusões intranucleares positivas para ubiquitina em neurônios e glia (Greco *et al.*, 2006; Hagerman *et al.*, 2001; Schluter *et al.*, 2012). Estas inclusões contêm os transcritos do gene *FMR1* com expansão de trinucleotídeos CGG e diversas proteínas, incluindo muitas com função de ligação a RNA e relacionadas ao estresse oxidativo (Iwahashi *et al.*, 2006), levando à proposição de que a superexpressão destes transcritos pode sequestrar proteínas reguladoras de RNA ao núcleo e, consequentemente desencadeando uma resposta ao estresse e o disfunção neuronal. As regiões encefálicas onde estas inclusões são identificadas devem representar aquelas com maior expressão do gene *FMR1*. Estas regiões são concordantes com nossas observações sobre a localização das isoformas $FMRP_{+12}ISO$. Em pacientes FXTAS e camundongos modelo KI, as inclusões intranucleares foram observadas no córtex cerebral frontal nas camadas I (camada molecular), II (camada granular externa) e III (camada piramidal externa) e também no córtex entorrinal e córtex motor. No hipocampo, estas inclusões são identificadas no hilu e giro denteado e na área

CA1. No cerebelo, as inclusões estão presentes na camada granular e nas células de Purkinje (Wenzel *et al.*, 2010).

De forma consistente com o modelo de toxicidade pelo RNAm do *FMR1* na fisiopatologia de FXTAS, observou-se uma redução de complexidade dendrítica e viabilidade em neurônios cultivados por 21 DIV, a partir da dissociação de hipocampo de fêmeas de camundongo KI (Chen *et al.*, 2010). No mesmo modelo animal KI, verificaram-se defeitos de migração e diferenciação neuronal na formação do córtex cerebral. Esses dados indicam que, embora com níveis regulares de FMRP, os elevados níveis de RNAm do *Fmr1* expresso a partir de alelos pré-mutados podem causar um déficit precoce durante a diferenciação neuronal. Uma vez que as $FMRP_{+12}$ISO devem ser funcionalmente relevantes ao processo de diferenciação neuronal normal durante a embriogênese, este modelo KI, em que há problemas nesse desenvolvimento, deve ser interessante para análise dessas isoformas. Outro aspecto interessante é que, sendo o *splicing* do pré-RNAm um evento cotranscricional (Almeida, de and Carmo-Fonseca, 2008), expansões de tripletos CGG, presentes na região 5' do transcrito do *FMR1* podem ter um efeito direto sobre a taxa de inclusão do éxon 12 no RNAm do *FMR1*. Se esse efeito for negativo, através da exclusão do éxon 12 do *Fmr1*, em um período em que as $FMRP_{+12}$ISO devem ser necessárias para a diferenciação neuronal, a falta da configuração longa da alça variável do domínio KH-2 da FMRP poderá ter um efeito deletério.

5.7 A configuração longa da alça variável do domínio KH-2 da FMRP

Sabe-se que o domínio KH-2 da FMRP se liga a RNAms em motivos com sequências definidas (Ascano *et al.*, 2012; Corbin *et al.*, 1997). Além

disso, demostrou-se que o domínio KH-2 da FMRP liga-se *in vitro* a uma estrutura secundária de RNA, denominada *kissing complex* (KcRNA) (Darnell and Fraser, 2005). A competição *in vitro* por KcRNA em excesso ou a presença da mutação p.I304N, que desestabiliza o domínio KH-2, faz com que a FMRP perca a capacidade de interagir com polirribossomos (Feng, Gutekunst, *et al.*, 1997; Mazroui *et al.*, 2003; Siomi *et al.*, 1994). Esta mutação também impede que a FMRP forme dímeros (Feng, Absher, *et al.*, 1997). A alça variável mais longa do KH-2 da FMRP mantém a especificidade de ligação aos KcRNAs; no entanto, esta ligação perde a estabilidade *in vitro* mais rapidamente do que a alça curta (Darnell *et al.*, 2009). Isto sugere que a presença do éxon 12 pode diminuir a estabilidade de todo domínio KH-2, fazendo com que a inclusão regulada deste éxon represente um efeito supressor nas interações da FMRP, pelo menos as associações a RNA. A fim de verificar se as isoformas $FMRP_{+12}ISO$ mantêm uma interação com polirribossomos similar às demais isoformas da FMRP *in vivo*, geramos lisados de córtex cerebral de animais em P12, em condições que favorecem a manutenção dos complexos polirribossomais. O perfil cromatográfico mostrou distribuição das $FMRP_{+12}ISO$ a complexos com massa em cerca de 1000 kDa, que devem ser representativos dos complexos polirribossômicos, embora não tenhamos avaliado o conteúdo de RNAr nessas frações. Essas isoformas distribuíram-se também a frações de massa molecular baixa (160 a 40 kDa), representando agrupamentos pequenos ou proteínas isoladas (Fig. 24). Esta distribuição sugere que *in vivo,* as isoformas que expressam a sequência do éxon 12 do *Fmr1* não perdem a capacidade de se ligar a polirribossomos. No entanto, a presença pronunciada das isoformas $FMRP_{+12}ISO$ nas frações com peptídeos

entre 160 e 40 kDa não descarta a hipótese de que a alça variável maior produza uma modulação de interação que desloque apenas parte das moléculas de FMRP para estas frações. O peptídeo de 28kDa, reconhecido pelo soro imune 3460, não foi observado nas frações correspondentes aos complexos polirribossomais. Tal fato sugere que esta proteína não possui capacidade de associação a RNA, e não possui relação com as isoformas da FMRP.

Como apresentado, o segmento codificado pelo éxon 12 do *FMR1* tem extensão constante (20 a 21 aminoácidos entre mamíferos). Este módulo e a sugestão de que a alça variável adote uma estrutura desordenada (Sjekloća *et al.*, 2009) indicam que a alça possa funcionar como uma plataforma para interações com outras proteínas que a estabilizem e que, dependentemente destas, duas configurações, aberta ou fechada, seriam possíveis, conferindo uma mudança conformacional sobre o dímero FXR. No cenário de um efeito supressor da interação com RNAs, a longa alça poderia dificultar o acesso tanto do próprio KH-2 quanto do domínio vizinho, RGG, aos seus alvos de RNA. Isso pode ser importante, por exemplo, às funções de transporte da FMRP, processo no qual se acredita que o complexo RNP da FMRP não esteja em contato com subunidades de ribossomo (Wang, H. *et al.*, 2008). Nos complexos macromoleculares, a $FMRP_{+12}$ISO poderia formar homodímero, homotípico, i.e, com outra molécula FMRP+12ISO, situação em que o acesso a RNA seria ainda mais difícil; ou homodímero, heterotípico, por exemplo, com uma molécula $FMRP_{-12}$ISO. A terceira alternativa seria a formação de heterodímero com FXR1P ou FXR2P. Uma vez demonstrado, no presente estudo, que as $FMRP_{+12}$ISO endógenas têm uma expressão significativa *in*

vivo, sugerindo relevância funcional, ensaios *in vitro* com FXR recombinantes serão necessários para se testar as hipóteses discutidas aqui.

6 Referências bibliográficas

ABERG, K. *et al.* Human QKI, a potential regulator of mRNA expression of human oligodendrocyte-related genes involved in schizophrenia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 19, p. 7482–7, 9 maio 2006.

ABITBOL, M. *et al.* Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. **nature genetics**, v. 4, n. 2, p. 147–153, 1993.

ABRAHAM, H.; MEYER, G. Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation. **Hippocampus**, v. 13, n. 6, p. 715–27, jan. 2003.

ADAMS-CIOABA, M. A. *et al.* Structural Studies of the Tandem Tudor Domains of Fragile X Mental Retardation Related Proteins FXR1 and FXR2. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e13559, nov. 2010.

ADINOLFI, S. *et al.* The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding. **Biochemistry**, v. 42, n. 35, p. 10437–10444, 2003.

ADINOLFI, S.; BAGNI, C.; MUSCO, G. Dissecting FMR1 , the protein responsible for fragile X syndrome , in its structural and functional domains. **Rna**, p. 1248–1258, 1999.

AGULHON, C. *et al.* Expression of FMR1, FXR1, and FXR2 genes in human prenatal tissues. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 58, n. 8, p. 867–80, ago. 1999.

AKINS, M. R. *et al.* Systematic mapping of fragile X granules in the mouse brain reveals a potential role for presynaptic FMRP in sensorimotor functions. **The Journal of comparative neurology**, v. 520, n. 16, p. 3687–706, 1 nov. 2012.

ALCÁNTARA, S. *et al.* Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 19, p. 7779–99, 1 out. 1998.

ALMEIDA, S. F. DE; CARMO-FONSECA, M. The CTD role in cotranscriptional RNA processing and surveillance. **FEBS Lett**, v. 582, n. 14, p. 1971–1976, jun. 2008.

ALTMAN, J.; DAS, G. D. Post-natal origin of microneurones in the rat brain. **Nature**, v. 207, n. 5000, p. 953–6, 28 ago. 1965.

ANTAR, L. N. *et al.* Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. **J Neurosci**, v. 24, n. 11, p. 2648–2655, 2004.

___. Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. **Genes Brain Behav**, v. 4, n. 6, p. 350–359, 2005.

ARMANO, S. *et al.* Long-term potentiation of intrinsic excitability at the mossy fiber-granule cell synapse of rat cerebellum. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 14, p. 5208–16, 15 jul. 2000.

ASCANO, M. *et al.* FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. **Nature**, v. 492, n. 7429, p. 382–386, 12 dez. 2012.

ASCHRAFI, A. *et al.* The fragile X mental retardation protein and group I metabotropic glutamate receptors regulate levels of mRNA granules in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 6, p. 2180–5, 8 fev. 2005.

ASHLEY, C. *et al.* Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. **Nat Genet**, v. 4, n. 3, p. 244–251, 1993.

ASHLEY, C. *et al.* FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. **Science**, v. 262, n. 5133, p. 563 – 566, out. 1993.

BÄCHNER, D. *et al.* Enhanced expression of the murine FMR1 gene during germ cell proliferation suggests a special function in both the male and the female gonad. **Human molecular genetics**, v. 2, n. 12, p. 2043–50, dez. 1993.

BAKKER, C. E. *et al.* Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. **Exp Cell Res**, v. 258, n. 1, p. 162–170, 2000.

BAKKER, C.; VERHEIJ, C.; WILLEMSEN, R. Fmr1 knockout mice: A model to study fragile X mental retardation. **Cell**, 1994.

BANERJEE, P. *et al.* Short- and long-term memory are modulated by multiple isoforms of the fragile X mental retardation protein. **J Neurosci**, v. 30, n. 19, p. 6782–6792, 2010.

BARANEK, G. T. *et al.* Developmental trajectories and correlates of sensory processing in young boys with fragile X syndrome. **Physical & occupational therapy in pediatrics**, v. 28, n. 1, p. 79–98, jan. 2008a.

___. Developmental trajectories and correlates of sensory processing in young boys with fragile X syndrome. **Physical & occupational therapy in pediatrics**, v. 28, n. 1, p. 79–98, jan. 2008b.

BARBEE, S. A. *et al.* Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. **Neuron**, v. 52, n. 6, p. 997–1009, 2006.

BARDONI, B. *et al.* Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein. **Neurobiol Dis**, v. 4, n. 5, p. 329–336, 1997.

BAYER, S.; ALTMAN, J. **Neocortical development**. Michigan: Raven Press, 1991. p. 255

BEFFERT, U. *et al.* Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. **Neuron**, v. 47, n. 4, p. 567–79, 18 ago. 2005.

BEGGS, J. A statistical theory of long-term potentiation and depression. **Neural computation**, 2001.

BEN-ARI, Y. *et al.* Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. **The Journal of physiology**, v. 416, n. 11, p. 303–25, 13 set. 1989.

BERRY-KRAVIS, E. *et al.* Tremor and ataxia in fragile X premutation carriers: blinded videotape study. **Annals of neurology**, v. 53, n. 5, p. 616–623, 2003.

BERRY-KRAVIS, E. *et al.* Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: clinical features, genetics, and testing guidelines. **Mov Disord**, v. 22, n. 14, p. 2018–30, quiz 2140, 2007.

BHATTACHARYYA, A. *et al.* Normal Neurogenesis but Abnormal Gene Expression in Human Fragile X Cortical Progenitor Cells. **Stem cells and development**, v. 17, n. 1, p. 107–17, fev. 2008.

BLACKWELL, E.; CEMAN, S. A new regulatory function of the region proximal to the RGG box in the Fragile X mental retardation protein. **Journal of cell science**, n. August, 24 ago. 2011.

BLACKWELL, E.; ZHANG, X.; CEMAN, S. Arginines of the RGG box regulate FMRP association with polyribosomes and mRNA. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 7, p. 1314–1323, 1 abr. 2010.

BLONDEN, L. *et al.* Two members of the Fxr gene family, Fmr1 and Fxr1, are differentially expressed in Xenopus tropicalis. **The International journal of developmental biology**, v. 49, n. 4, p. 437–41, jan. 2005.

BOLDUC, F. V *et al.* Excess protein synthesis in Drosophila fragile X mutants impairs long-term memory. **Nature neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 1143–5, out. 2008.

BONTEKOE, C. J. M. *et al.* Knockout mouse model for Fxr2: a model for mental retardation. **Human molecular genetics**, v. 11, n. 5, p. 487–98, 1 mar. 2002.

BOTELLA-LÓPEZ, A. *et al.* Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 14, p. 5573–8, 4 abr. 2006.

BOULLE, K. DE; VERKERK, A.; REYNIERS, E. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. **Nature …**, 1993.

BRACKETT, D. M. *et al.* FMR1 transcript isoforms: association with polyribosomes; regional and developmental expression in mouse brain. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58296, jan. 2013.

BROWN, M. R. *et al.* Fragile X mental retardation protein controls gating of the sodium-activated potassium channel Slack. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 7, p. 819–21, jul. 2010.

BROWN, V. *et al.* Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15521–7, 19 jun. 1998.

___. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 477–487, 2001.

BRYKAILO, M. A; CORBETT, A. H.; FRIDOVICH-KEIL, J. L. Functional overlap between conserved and diverged KH domains in Saccharomyces cerevisiae SCP160. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 4, p. 1108–18, jan. 2007.

BUCKLEY, P. T. *et al.* Cytoplasmic Intron Sequence-Retaining Transcripts Can Be Dendritically Targeted via ID Element Retrotransposons. **Neuron**, v. 69, n. 5, p. 877–84, 10 mar. 2011.

CALLAN, M. A. *et al.* Fragile X protein controls neural stem cell proliferation in the Drosophila brain. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 15, p. 3068–79, 1 ago. 2010.

CASTRÉN, M. *et al.* Altered differentiation of neural stem cells in fragile X syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 49, p. 17834–9, dez. 2005.

CEMAN, S. *et al.* Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. **Human molecular …**, v. 12, n. 24, p. 3295–305, 15 dez. 2003.

CHEEVER, A.; CEMAN, S. Phosphorylation of FMRP inhibits association with Dicer. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 15, n. 3, p. 362–6, mar. 2009.

CHEN, L.; TOTH, M. Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli. **Neuroscience**, v. 103, n. 4, p. 1043–50, jan. 2001.

CHEN, T. *et al.* Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 10, p. 5707–18, out. 1997.

CHEN, Y. *et al.* The selective RNA-binding protein quaking I (QKI) is necessary and sufficient for promoting oligodendroglia differentiation. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 32, p. 23553–60, 10 ago. 2007.

CHEN, Y. *et al.* Murine hippocampal neurons expressing Fmr1 gene premutations show early developmental deficits and late degeneration. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 1, p. 196–208, jan. 2010.

CHERUBINI, E.; GAIARSA, J. L.; BEN-ARI, Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. **Trends in neurosciences**, v. 14, n. 12, p. 515–9, dez. 1991.

CHIN, J. *et al.* Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2727–33, 14 mar. 2007.

CHRISTIE, S. B. *et al.* The FXG: a presynaptic fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits. **J Neurosci**, v. 29, n. 5, p. 1514–1524, 2009.

COFFEE, R. L. *et al.* In vivo neuronal function of the fragile X mental retardation protein is regulated by phosphorylation. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 4, p. 900–15, 11 nov. 2011.

COLLINS, R. E.; CHENG, X. Structural domains in RNAi. **FEBS Lett**, v. 579, n. 26, p. 5841–5849, 2005.

COMERY, T. A. *et al.* Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 5401–4, maio 1997.

COMERY, T.; HARRIS, J. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. **Proceedings of the …**, v. 94, n. May, p. 5401–5404, 1997.

CORBIN, F. *et al.* The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)+ mRNA in actively translating polyribosomes. **Human molecular genetics**, v. 6, n. 9, p. 1465–72, set. 1997.

COSTA, M. R. *et al.* Late origin of glia-restricted progenitors in the developing mouse cerebral cortex. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 19 Suppl 1, p. i135–43, jul. 2009.

CRUZ-MARTÍN, A. *et al.* Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. **J Neurosci**, v. 30, n. 23, p. 7793–7803, jun. 2010.

CUNNINGHAM, C. L. *et al.* Premutation CGG-repeat expansion of the Fmr1 gene impairs mouse neocortical development. **Hum Mol Genet**, 2010.

CURRIE, J. R.; BROWN, W. T. KH domain-containing proteins of yeast: absence of a fragile X gene homologue. **American journal of medical genetics**, v. 84, n. 3, p. 272–6, 28 maio 1999.

DARNELL; FRASER. Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. **Genes & …**, p. 903–918, 2005.

DARNELL, J. C. *et al.* Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 489–499, 2001.

DARNELL, J. C. *et al.* Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. **Human molecular genetics**, v. 18, n. 17, p. 3164–77, 1 set. 2009.

DARNELL, J. C. C. J. *et al.* FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. **Cell**, v. 146, n. 2, p. 247–261, 22 jul. 2011.

DAVIDOVIC, L. *et al.* The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. **Hum Mol Genet**, v. 16, n. 24, p. 3047–3058, 2007.

DENG, P.-Y.; SOJKA, D.; KLYACHKO, V. A. Abnormal presynaptic short-term plasticity and information processing in a mouse model of fragile X syndrome. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 30, p. 10971–82, 27 jul. 2011.

DENMAN, R. B.; DOLZHANSKAYA, N.; SUNG, Y. J. Regulating a translational regulator: mechanisms cells use to control the activity of the fragile X mental retardation protein. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 14, p. 1714–28, jul. 2004.

DENMAN, R. B.; SUNG, Y. J. Species-specific and isoform-specific RNA binding of human and mouse fragile X mental retardation proteins. **Biochemical and biophysical research**, v. 292, n. 4, p. 1063–1069, 2002.

DESAI, N. S. *et al.* Early Postnatal Plasticity in Neocortex of Fmr1 Knockout Mice. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, n. 4, p. 1734–1745, 28 jun. 2006.

DEVYS, D. *et al.* The FMR-1 protein is cytoplasmatic, most abundant in neurons and appears normal in carries of a fragile X premutation. **Nature genetics**, v. 4, n. 4, p. 335–340, 1993.

DIEGO OTERO, Y. DE *et al.* Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. **Molecular and cellular biologyand cellular biology**, v. 22, n. 23, p. 8332–8341, 2002.

DOEHNER, J.; KNUESEL, I. Reelin-mediated Signaling during Normal and Pathological Forms of Aging. **Aging and disease**, v. 1, n. 1, p. 12–29, ago. 2010.

DOLZHANSKAYA, N.; MERZ, G.; ALETTA, J. Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. **Journal of cell science**, 2006.

DOLZHANSKAYA, N.; MERZ, G.; DENMAN, R. B. Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. **Biochemistry**, v. 45, n. 34, p. 10385–10393, 2006.

DUBÉ, M.; HUOT, M. E.; KHANDJIAN, E. W. Muscle specific fragile X related protein 1 isoforms are sequestered in the nucleus of undifferentiated myoblast. **BMC genetics**, v. 1, p. 4, jan. 2000.

DURAN, R. *et al.* Domoic acid induces neurotoxicity and ip3 mobilization in cultured cells of embryonic chick retina. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 28, n. 1, p. 100–7, jan. 1995.

EBERHART, D. E. *et al.* The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. **Hum Mol Genet**, v. 5, n. 8, p. 1083–1091, 1996.

EDBAUER, D. *et al.* Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. **Neuron**, v. 65, n. 3, p. 373–84, 11 fev. 2010.

EICHLER, E. E. *et al.* Fine structure of the human FMR1 gene. **Hum Mol Genet**, v. 2, n. 8, p. 1147–1153, 1993.

FAGIOLINI, M.; HENSCH, T. K. Inhibitory threshold for critical-period activation in primary visual cortex. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 183–6, 9 mar. 2000.

FATEMI, S. H. *et al.* Phosphodiesterase signaling system is disrupted in the cerebella of subjects with schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. **Schizophrenia research**, v. 119, n. 1-3, p. 266–7, jun. 2010.

FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D. The Role of Fragile X Mental Retardation Protein in Major Mental Disorders. **Neuropharmacology**, n. November, p. 1–6, nov. 2010.

___. Dysregulation of fragile × mental retardation protein and metabotropic glutamate receptor 5 in superior frontal cortex of individuals with autism: a postmortem brain study. **Molecular autism**, v. 2, p. 6, jan. 2011.

FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D.; THURAS, P. D. Deficits in GABA(B) receptor system in schizophrenia and mood disorders: a postmortem study. **Schizophrenia research**, v. 128, n. 1-3, p. 37–43, maio 2011.

FATIMY, R. EL *et al.* Fragile X mental retardation protein interacts with the RNA-binding protein Caprin1 in neuronal RiboNucleoProtein complexes [corrected]. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39338, jan. 2012.

FENG, Y. *et al.* Quantitative comparison of FMR1 gene expression in normal and premutation alleles. **American journal of human genetics**, v. 56, n. 1, p. 106–13, jan. 1995.

FENG, Y.; GUTEKUNST, C. A.; *et al.* Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. **J Neurosci**, v. 17, n. 5, p. 1539–1547, 1997.

FENG, Y.; ABSHER, D.; *et al.* FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. **Molecular cell**, v. 1, n. 1, p. 109–18, dez. 1997.

FERRARI, F. *et al.* The fragile X mental retardation protein-RNP granules show an mGluR-dependent localization in the post-synaptic spines. **Mol Cell Neurosci**, v. 34, n. 3, p. 343–354, 2007.

FIALA, J.; FEINBERG, M. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. **The Journal of …**, 1998.

FORNEROD, M. *et al.* CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. **Cell**, v. 90, n. 6, p. 1051–60, 19 set. 1997.

FRIDELL, R. A. *et al.* A nuclear role for the Fragile X mental retardation protein. **Embo J**, v. 15, n. 19, p. 5408–5414, 1996.

FU, Y. H. *et al.* Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1047–1058, 1991.

GABEL, L. A *et al.* Visual experience regulates transient expression and dendritic localization of fragile X mental retardation protein. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 47, p. 10579–83, 24 nov. 2004.

GALVEZ, R.; GREENOUGH, W. T. Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 135, n. 2, p. 155–60, jun. 2005a.

___. Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 135, n. 2, p. 155–60, 1 jun. 2005b.

GARASCHUK, O.; HANSE, E.; KONNERTH, A. Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. **The Journal of physiology**, v. 507 (Pt 1, p. 219–36, 15 fev. 1998.

GARCIA-AROCENA, D.; HAGERMAN, P. J. Advances in understanding the molecular basis of FXTAS. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. R1, p. R83–9, 2010.

GAREAU, C.; HOUSSIN, E.; *et al.* Characterization of fragile X mental retardation protein recruitment and dynamics in Drosophila stress granules. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e55342, jan. 2013.

GAREAU, C.; MARTEL, D.; *et al.* Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein granules formation and dynamics in Drosophila. **Biology open**, v. 2, n. 1, p. 68–81, 15 jan. 2013.

GATTO, C. L.; BROADIE, K. Temporal requirements of the fragile x mental retardation protein in modulating circadian clock circuit synaptic architecture. **Frontiers in neural circuits**, v. 3, p. 8, jan. 2009.

GEYER, M. A. *et al.* Effects of LU-111995 in three models of disrupted prepulse inhibition in rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 290, n. 2, p. 716–24, ago. 1999.

GIUDITTA, A. *et al.* Local gene expression in axons and nerve endings: the glia-neuron unit. **Physiological reviews**, v. 88, n. 2, p. 515–55, abr. 2008.

GOCEL, J.; LARSON, J. Synaptic NMDA receptor-mediated currents in anterior piriform cortex are reduced in the adult fragile X mouse. **Neuroscience**, v. 221, p. 170–81, 27 set. 2012.

GONÇALVES, M. R. R. *et al.* Atypical clinical course of FXTAS: rapidly progressive dementia as the major symptom. **Neurology**, v. 68, n. 21, p. 1864–6, 22 maio 2007.

GRECO, C. M. *et al.* Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). **Brain**, v. 129, n. Pt 1, p. 243–255, 2006.

GREENOUGH, W. T. *et al.* Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 13, p. 7101–7106, 2001.

GRIGSBY, J. *et al.* Impairment in the cognitive functioning of men with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). **Journal of the neurological sciences**, v. 248, n. 1-2, p. 227–33, 25 out. 2006.

GROC, L. *et al.* NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 38, p. 10165–75, 19 set. 2007.

GROSS, C.; BASSELL, G. J. Excess protein synthesis in FXS patient lymphoblastoid cells can be rescued with a p110β-selective inhibitor. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 18, p. 336–45, jan. 2012.

HAGERMAN, R. J. *et al.* Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. **American journal of medical genetics**, v. 17, n. 1, p. 111–21, jan. 1984.

HAGERMAN, R. J. *et al.* Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. **Neurology**, v. 57, n. 57, p. 127–130, 2001.

HARRIS, K. M.; JENSEN, F. E.; TSAO, B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. **J Neurosci**, v. 12, n. 7, p. 2685–2705, 1992.

HENSCH, T. K. *et al.* Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5393, p. 1504–8, 20 nov. 1998.

HENSCH, T. K. Critical period plasticity in local cortical circuits. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 877–88, nov. 2005.

HERGERSBERG, M. *et al.* Tissue-specific expression of a FMR1/beta-galactosidase fusion gene in transgenic mice. **Human molecular genetics**, v. 4, n. 3, p. 359–66, mar. 1995.

HERZ, J.; CHEN, Y. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 11, p. 850–9, nov. 2006.

HESSL, D. *et al.* Abnormal elevation of FMR1 mRNA is associated with psychological symptoms in individuals with the fragile X premutation. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 139B, n. 1, p. 115–121, 2005.

HINDS, H. L. *et al.* Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. **Nat Genet**, v. 3, n. 1, p. 36–43, 1993.

HOEFFER, C. A *et al.* Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with Fragile X syndrome. **Genes, brain, and behavior**, 23 jan. 2012.

HOELLINGER, T. *et al.* Biological oscillations for learning walking coordination: dynamic recurrent neural network functionally models physiological central pattern generator. **Frontiers in computational neuroscience**, v. 7, p. 70, jan. 2013.

HSIA, A. Y.; MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Development of excitatory circuitry in the hippocampus. **Journal of neurophysiology**, v. 79, n. 4, p. 2013–24, abr. 1998.

HUANG, T. *et al.* Alternative splicing of the FMR1 gene in human fetal brain neurons. **American journal of medical genetics**, v. 64, n. 2, p. 252–5, 9 ago. 1996.

HUBER, K. M. *et al.* Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 11, p. 7746–7750, 2002.

HUNTER, J. E. *et al.* Fragile X-associated primary ovarian insufficiency: evidence for additional genetic contributions to severity. **Genetic epidemiology**, v. 32, n. 6, p. 553–9, set. 2008.

IACOANGELI, A. *et al.* On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 2, p. 734–9, 15 jan. 2008a.

___. Reply to Bagni: On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 22, p. E29, 3 jun. 2008b.

IRWIN, S. A. *et al.* Evidence for altered Fragile-X mental retardation protein expression in response to behavioral stimulation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 73, n. 1, p. 87–93, jan. 2000.

IRWIN, S. A. *et al.* Fragile X mental retardation protein levels increase following complex environment exposure in rat brain regions undergoing active synaptogenesis. **Neurobiology of learning and memory**, v. 83, n. 3, p. 180–7, maio 2005.

IWAHASHI, C. K. *et al.* Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. **Brain**, v. 129, n. Pt 1, p. 256–271, 2006.

JACQUEMONT, S. *et al.* Fragile X Premutation Tremor / Ataxia Syndrome : Molecular , Clinical , and Neuroimaging Correlates. **American journal of human genetics**, v. 72, n. 4, p. 869–878, abr. 2003.

___. Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. **Jama**, v. 291, n. 4, p. 460–9, jan. 2004.

JACQUEMONT, S.; FARZIN, F.; HALL, D. Aging in individuals with the FMR1 mutation. **Journal**, 2004.

JIN, P. *et al.* Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 113–7, fev. 2004.

JONTES, J. D.; SMITH, S. J. Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. **Neuron**, v. 27, n. 1, p. 11–14, 2000.

JORDAN, M. A; THROWER, D.; WILSON, L. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. **Journal of cell science**, v. 102 (Pt 3, p. 401–16, jul. 1992.

KAU, A. S. M.; MEYER, W. A.; KAUFMANN, W. E. Early development in males with Fragile X syndrome: a review of the literature. **Microscopy research and technique**, v. 57, n. 3, p. 174–8, 1 maio 2002.

KHANAM, T. *et al.* Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 and 3+4. **RNA biology**, v. 3, n. 4, p. 170–7, out. 2006.

___. Can ID repetitive elements serve as cis-acting dendritic targeting elements? An in vivo study. **PloS one**, v. 2, n. 9, p. e961, jan. 2007.

KHANDJIAN, E. W. *et al.* A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. **Hum Mol Genet**, v. 4, n. 5, p. 783–789, 1995.

KHANDJIAN, E. W. *et al.* Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 36, p. 13357–62, 7 set. 2004.

KHANDJIAN, E. W. E. W. *et al.* The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. **Nature genetics**, v. 12, n. 1, p. 91–93, 1996.

KIM, M.; BELLINI, M.; CEMAN, S. Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 1, p. 214–28, jan. 2009.

KIM, S. H. *et al.* Fragile X mental retardation protein shifts between polyribosomes and stress granules after neuronal injury by arsenite stress or in vivo hippocampal electrode insertion. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 9, p. 2413–8, 1 mar. 2006.

KIRKPATRICK, L. L.; MCILWAIN, K. A.; NELSON, D. L. Alternative splicing in the murine and human FXR1 genes. **Genomics**, v. 59, n. 2, p. 193–202, 15 jul. 1999.

___. Comparative genomic sequence analysis of the FXR gene family: FMR1, FXR1, and FXR2. **Genomics**, v. 78, n. 3, p. 169–177, 2001.

KOEKKOEK, S. K. *et al.* Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. **Neuron**, v. 47, n. 3, p. 339–352, 2005.

KREMER, E. J. *et al.* Isolation of a human DNA sequence which spans the fragile X. **Am J Hum Genet**, v. 49, n. 3, p. 656–661, 1991.

LACOR, P. N. *et al.* Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3556–61, 28 mar. 2000.

LACOUX, C. *et al.* BC1-FMRP interaction is modulated by 2'-O-methylation: RNA-binding activity of the tudor domain and translational regulation at synapses. **Nucleic acids research**, p. 1–11, 11 jan. 2012.

LAGGERBAUER, B. *et al.* Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 4, p. 329–338, 2001.

LANDIS, D. Initial junctions between developing parallel fibers and Purkinje cells are different from mature synaptic junctions. **Journal of Comparative Neurology**, 1987.

LARGO, R. H.; SCHINZEL, A. Developmental and behavioural disturbances in 13 boys with fragile X syndrome. **European journal of pediatrics**, v. 143, n. 4, p. 269–75, mar. 1985.

LAROCQUE, D. *et al.* Nuclear retention of MBP mRNAs in the quaking viable mice. **Neuron**, v. 36, n. 5, p. 815–29, 5 dez. 2002.

LARSON, J. *et al.* Age-dependent and selective impairment of long-term potentiation in the anterior piriform cortex of mice lacking the fragile X mental retardation protein. **J Neurosci**, v. 25, n. 41, p. 9460–9469, 2005.

LAVAL, S. H. *et al.* Mapping of FMR1, the gene implicated in fragile X-linked mental retardation, on the mouse X chromosome. **Genomics**, v. 12, n. 4, p. 818–21, abr. 1992.

LAZAROV, O. *et al.* Impaired survival of neural progenitor cells in dentate gyrus of adult mice lacking FMRP. **Hippocampus**, v. 000, p. 1–5, 30 nov. 2011.

LEEHEY, M. A. *et al.* Progression of tremor and ataxia in male carriers of the FMR1 premutation. **Movement disorders**, v. 22, n. 2, p. 203–206, jan. 2007.

LEINEKUGEL, X. *et al.* Ca2+ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. **Neuron**, v. 18, n. 2, p. 243–55, fev. 1997.

LING, S. C. *et al.* Transport of Drosophila fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 50, p. 17428–17433, 2004.

LIU, Z. *et al.* Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5544, p. 1098–102, 2 nov. 2001.

LOESCH, D. Z.; HAY, D. A. Clinical features and reproductive patterns in fragile X female heterozygotes. **Journal of medical genetics**, v. 25, n. 6, p. 407–14, jun. 1988.

LÖTSCH, J. *et al.* Functional genomics suggest neurogenesis in the adult human olfactory bulb. **Brain structure & function**, 9 ago. 2013.

LU, C. *et al.* Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice. **Human molecular genetics**, v. 21, n. 23, p. 5039–47, 1 dez. 2012.

LUBS, H. A marker X chromosome. **American journal of human genetics**, v. 21, n. 3, p. 231, 1969.

LUBS, H. A. *et al.* Restudy of the original marker X family. **American journal of medical genetics**, v. 17, n. 1, p. 133–44, jan. 1984.

LUO, Y. *et al.* Fragile x mental retardation protein regulates proliferation and differentiation of adult neural stem/progenitor cells. **PLoS genetics**, v. 6, n. 4, p. e1000898, abr. 2010.

MAGUIRE, M. L. *et al.* Solution structure and backbone dynamics of the KH-QUA2 region of the Xenopus STAR/GSG quaking protein. **Journal of molecular biology**, v. 348, n. 2, p. 265–79, 29 abr. 2005.

MARÍN, A. B. S. **Capacidade proliferativa in vitro de precursores neuro-gliais, telencefálicos e expressão dos genes 1 e 2 do Complexo da Esclerose Tuberosa (TSC1 e TSC2)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

MARINO, D. DI; ACHSEL, T. Molecular dynamics simulations show how the FMRP Ile304Asn mutation destabilizes the KH2 domain structure and affects its function. **… and Dynamics**, 2013.

MATSUNAGA, M. *et al.* Brain-immune interaction accompanying odor-evoked autobiographic memory. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e72523, jan. 2013.

MAURER-STROH, S. *et al.* The Tudor domain "Royal Family": Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 2, p. 69–74, 2003.

MAZROUI, R. *et al.* Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. **Human molecular**, v. 11, n. 24, p. 3007–3017, 15 nov. 2002.

___. Fragile X Mental Retardation protein determinants required for its association with polyribosomal mRNPs. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 23, p. 3087–96, 1 dez. 2003.

MCALONAN, G. M. *et al.* Brain anatomy and sensorimotor gating in Asperger's syndrome. **Brain : a journal of neurology**, v. 125, n. Pt 7, p. 1594–606, jul. 2002.

MERYASH, D. L. *et al.* An anthropometric study of males with the fragile-X syndrome. **American journal of medical genetics**, v. 17, n. 1, p. 159–74, jan. 1984.

MIENTJES, E. J. *et al.* Fxr1 knockout mice show a striated muscle phenotype: implications for Fxr1p function in vivo. **Human molecular genetics**, v. 13, n. 13, p. 1291–302, 1 jul. 2004.

MIENTJES, E. J. *et al.* The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. **Neurobiology of disease**, v. 21, n. 3, p. 549–55, mar. 2006.

MILLER, L. J. *et al.* Electrodermal responses to sensory stimuli in individuals with fragile X syndrome: a preliminary report. **American journal of medical genetics**, v. 83, n. 4, p. 268–79, 2 abr. 1999.

MIYASHIRO, K. Y. *et al.* RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. **Neuron**, v. 37, n. 3, p. 417–31, 6 fev. 2003.

MONTAGNON, M. *et al.* Transition from normal to premutated alleles in fragile X syndrome results from a multistep process. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 2, n. 2, p. 125–31, jan. 1994.

MUDDASHETTY, R. S. *et al.* Reversible Inhibition of PSD-95 mRNA Translation by miR-125a, FMRP Phosphorylation, and mGluR Signaling. **Molecular cell**, v. 42, n. 5, p. 673–88, 10 jun. 2011.

MUSLIMOV, I. A. *et al.* RNA transport in dendrites: a cis-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 4722–33, 15 jun. 1997.

NAPOLI, I. *et al.* The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 1042–54, 19 set. 2008.

NARAYANAN, U. *et al.* FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 52, p. 14349–57, 26 dez. 2007.

___. S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 27, p. 18478–82, jul. 2008.

NIMCHINSKY, E. A.; OBERLANDER, A. M.; SVOBODA, K. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. **J Neurosci**, v. 21, n. 14, p. 5139–5146, 2001.

NOSYREVA, E. D.; HUBER, K. M. Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of fragile X syndrome. **Journal of neurophysiology**, v. 95, n. 5, p. 3291–5, maio 2006.

OBERLE, I. *et al.* Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. **Science**, v. 252, n. 5010, p. 1097–1102, 24 maio 1991.

OHASHI, S. *et al.* Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. **J Biol Chem**, v. 277, n. 40, p. 37804–37810, 2002.

OWENS, D. F.; KRIEGSTEIN, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 715–27, set. 2002.

PACEY, L. K.; DOERING, L. C. Developmental expression of FMRP in the astrocyte lineage: implications for fragile X syndrome. **Glia**, v. 1609, n. December 2006, p. 1601–1609, 2007.

PAN, F. *et al.* Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 41, p. 17768–17773, 2010.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. sixth edition. **Academic Press, San Diego**, 2007.

PECENKA, N.; ENGEL, A.; KELLER, P. E. Neural correlates of auditory temporal predictions during sensorimotor synchronization. **Frontiers in human neuroscience**, v. 7, p. 380, jan. 2013.

PEDROTTI, S. *et al.* The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. **The EMBO journal**, v. 29, n. 7, p. 1235–47, 7 abr. 2010.

PENCEA, V. *et al.* Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. **Experimental neurology**, v. 172, n. 1, p. 1–16, nov. 2001.

PETRALIA, R. S. *et al.* Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 1, p. 31–6, jan. 1999.

PFEIFFER, B. E. *et al.* Fragile X mental retardation protein is required for synapse elimination by the activity-dependent transcription factor MEF2. **Neuron**, v. 66, n. 2, p. 191–7, 29 abr. 2010.

PFEIFFER, B. E.; HUBER, K. M. Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 27, p. 7147–50, 5 jul. 2006.

PHAN, A. T. *et al.* Structure-function studies of FMRP RGG peptide recognition of an RNA duplex-quadruplex junction. **Nature structural & molecular biology**, v. 18, n. 7, p. 796–804, 5 jan. 2011.

PLEASURE, S. J.; COLLINS, A. E.; LOWENSTEIN, D. H. Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 16, p. 6095–105, 15 ago. 2000.

POLYAK, K. *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. **Genes & Development**, v. 8, n. 1, p. 9–22, 1 jan. 1994.

PRICE, D. D.; VERNE, G. N.; SCHWARTZ, J. M. Plasticity in brain processing and modulation of pain. **Progress in brain research**, v. 157, p. 333–352, jan. 2006.

QIN, M. *et al.* Postadolescent changes in regional cerebral protein synthesis: an in vivo study in the FMR1 null mouse. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 20, p. 5087–95, 18 maio 2005.

QIU, S.; WEEBER, E. J. Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. **Journal of neurophysiology**, v. 97, n. 3, p. 2312–21, mar. 2007.

RAMOS, A. *et al.* The structure of the N-terminal domain of the fragile X mental retardation protein: a platform for protein-protein interaction. **Structure**, v. 14, n. 1, p. 21–31, jan. 2006.

RIVERA, C. *et al.* The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 251–5, 21 jan. 1999.

ROBERTS, J. E. *et al.* Autistic behavior in boys with fragile X syndrome: social approach and HPA-axis dysfunction. **Journal of neurodevelopmental disorders**, v. 1, n. 4, p. 283–91, dez. 2009.

ROY, S. *et al.* Comprehensive motor testing in Fmr1-KO mice exposes temporal defects in oromotor coordination. **Behavioral neuroscience**, v. 125, n. 6, p. 962–9, dez. 2011.

SADAKA, Y. *et al.* Changes in mouse barrel synapses consequent to sensory deprivation from birth. **The Journal of comparative neurology**, v. 457, n. 1, p. 75–86, 24 fev. 2003.

SAFFARY, R.; XIE, Z. FMRP regulates the transition from radial glial cells to intermediate progenitor cells during neocortical development. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 4, p. 1427–1439, 2011.

SAVARY, E.; HUGNOT, J.; CHASSIGNEUX, Y. Distinct population of hair cell progenitors can be isolated from the postnatal mouse cochlea using side population analysis. **… Cells**, 2007.

SCHAEFFER, C. *et al.* The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. **The EMBO**, v. 20, n. 17, p. 4803–4813, 3 set. 2001.

SCHLESSINGER, A. R.; COWAN, W. M.; GOTTLIEB, D. I. An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 159, n. 2, p. 149–75, 15 jan. 1975.

SCHLUTER, E. W. *et al.* Distribution and frequency of intranuclear inclusions in female CGG KI mice modeling the fragile X premutation. **Brain research**, p. 1–14, 11 jul. 2012.

SCHRIER, M. *et al.* Transport kinetics of FMRP containing the I304N mutation of severe fragile X syndrome in neurites of living rat PC12 cells. **Experimental neurology**, v. 189, n. 2, p. 343–353, out. 2004.

SCHÜTT, J. *et al.* Fragile X mental retardation protein regulates the levels of scaffold proteins and glutamate receptors in postsynaptic densities. **J Biol Chem**, v. 284, n. 38, p. 25479–25487, 18 set. 2009.

SCOTTO-LOMASSESE, S. *et al.* Fragile X Mental Retardation Protein Regulates New Neuron Differentiation in the Adult Olfactory Bulb. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 6, p. 2205, fev. 2011.

SÉVIN, M. *et al.* Penetrance of marked cognitive impairment in older male carriers of the FMR1 gene premutation. **Journal of medical genetics**, v. 46, n. 12, p. 818–24, dez. 2009.

SHERIDAN, S. D. *et al.* Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile x syndrome. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e26203, jan. 2011.

SHTANG, S.; PERRY, M. D.; PERCY, M. E. Search for a Caenorhabditis elegans FMR1 homologue: identification of a new putative RNA-binding protein (PRP-1) that

hybridizes to the mouse FMR1 double K homology domain. **American journal of medical genetics**, v. 84, n. 3, p. 283–5, 28 maio 1999.

SIOMI, H. *et al.* The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. **Cell**, v. 74, n. 2, p. 291–298, jul. 1993.

SIOMI, H. *et al.* Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. **Cell**, v. 77, n. 1, p. 33–9, 8 abr. 1994.

SIOMI, M. C. *et al.* FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. **The EMBO journal**, v. 14, n. 11, p. 2401–8, 1 jun. 1995.

___. 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**, v. 16, n. 7, p. 3825–3832, 1996.

SITTLER, A. *et al.* Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. **Hum Mol Genet**, v. 5, n. 1, p. 95–102, 1996.

SJEKLOĆA, L. *et al.* A study of the ultrastructure of fragile-X-related proteins. **The Biochemical journal**, v. 419, n. 2, p. 347–57, 15 abr. 2009.

SORIANO, E.; COBAS, A.; FAIRÉN, A. Asynchronism in the neurogenesis of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse hippocampus. **Brain research**, v. 395, n. 1, p. 88–92, nov. 1986.

STALEY, J. P. Hanging on to the branch. **Nature structural biology**, v. 9, n. 1, p. 5–7, jan. 2002.

STAUBLI, U.; LYNCH, G. Stable hippocampal long-term potentiation elicited by “theta” pattern stimulation. **Brain research**, v. 435, n. 1-2, p. 227–34, 1 dez. 1987.

STRUCKHOFF, A. P.; VALLE, L. DEL. Neurospheres and glial cell cultures: immunocytochemistry for cell phenotyping. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1078, p. 119–32, jan. 2013.

STUDENT. The probable error of a mean. **Biometrika**, 1908.

SUTTON, M. A.; SCHUMAN, E. M. Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. **Journal of neurobiology**, v. 64, n. 1, p. 116–31, jul. 2005.

SUVRATHAN, A. *et al.* Characterization and reversal of synaptic defects in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 25, p. 11591–6, 22 jun. 2010.

TAMANINI, F. *et al.* Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. **Human molecular genetics**, v. 6, n. 8, p. 1315–22, ago. 1997.

___. Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. **Hum Mol Genet**, v. 8, n. 5, p. 863–869, 1999.

TAMANINI, F.; UNEN, L. VAN. Oligomerization properties of fragile-X mental-retardation protein (FMRP) and the fragile-X-related proteins FXR1P and FXR2P. **Biochemical …**, v. 523, p. 517–523, 1999.

TASSONE, F. *et al.* CGG repeat length correlates with age of onset of motor signs of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 144B, n. 4, p. 566–9, jun. 2007.

TERVONEN, T. A *et al.* Aberrant differentiation of glutamatergic cells in neocortex of mouse model for fragile X syndrome. **Neurobiology of disease**, v. 33, n. 2, p. 250–9, fev. 2009.

TERVONEN, T. A. *et al.* Aberrant differentiation of glutamatergic cells in neocortex of mouse model for fragile X syndrome. **Neurobiology of disease**, v. 33, n. 2, p. 250–9, fev. 2009.

TILL, S. M. *et al.* Altered maturation of the primary somatosensory cortex in a mouse model of fragile X syndrome. **Human molecular genetics**, p. 1–48, 27 fev. 2012.

TODD, P. K.; MACK, K. J. Sensory stimulation increases cortical expression of the fragile X mental retardation protein in vivo. **Brain research. Molecular brain research**, v. 80, n. 1, p. 17–25, 14 ago. 2000.

TODD, P. K.; MALTER, J. S.; MACK, K. J. Whisker stimulation-dependent translation of FMRP in the barrel cortex requires activation of type I metabotropic glutamate receptors. **Brain research. Molecular brain research**, v. 110, n. 2, p. 267–78, 20 fev. 2003.

TUCKER, B.; RICHARDS, R.; LARDELLI, M. Expression of three zebrafish orthologs of human FMR1-related genes and their phylogenetic relationships. **Development genes and evolution**, v. 214, n. 11, p. 567–74, nov. 2004.

TURETSKY, B. I. *et al.* Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. **Schizophrenia bulletin**, v. 33, n. 1, p. 69–94, jan. 2007.

TURNER, G. *et al.* Prevalence of fragile X syndrome. **American journal of medical genetics**, v. 64, n. 1, p. 196–7, 12 jul. 1996.

ULLMAN, K. S.; POWERS, M. A.; FORBES, D. J. Nuclear export receptors: from importin to exportin. **Cell**, v. 90, n. 6, p. 967–70, 19 set. 1997.

VALACCA, C. *et al.* Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. **J Cell Biol**, v. 191, n. 1, p. 87–99, 2010.

VALENTINE, G. *et al.* Fragile X (fmr1) mRNA expression is differentially regulated in two adult models of activity-dependent gene expression. **Brain research**, v. 22, n. 75, p. 337–341, 2000.

VALVERDE, R. *et al.* Fragile X mental retardation syndrome: structure of the KH1-KH2 domains of fragile X mental retardation protein. **Structure**, v. 15, n. 9, p. 1090–1098, 2007.

VELLOSO, F. **Expressão de isoformas da proteína do retardo mental do X frágil (FMRP) e sua regulação**. [s.l.] Universidade de são Paulo, 2008.

VENTRUTI, A. *et al.* Reelin deficiency causes specific defects in the molecular composition of the synapses in the adult brain. **Neuroscience**, v. 189, p. 32–42, 25 ago. 2011.

VERHEIJ, C. *et al.* Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. **Group**, v. 363, n. 6431, p. 722–724, 1993.

VERHEIJ, C. *et al.* Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. **Hum Mol Genet**, v. 4, n. 5, p. 895–901, 1995.

VERKERK, A. J. *et al.* Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, v. 65, n. 5, p. 905–914, maio 1991.

VERKERK, A. J. *et al.* Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. **Hum Mol Genet**, v. 2, n. 8, p. 1348, 1993.

VILLERS-SIDANI, E. DE *et al.* Critical period window for spectral tuning defined in the primary auditory cortex (A1) in the rat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 180–9, 3 jan. 2007.

WAN, L. *et al.* Characterization of dFMR1, a Drosophila melanogaster homolog of the fragile X mental retardation protein. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 22, p. 8536–47, nov. 2000.

WANG, E. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 470–476, 2008.

WANG, H. *et al.* Dynamic association of the fragile X mental retardation protein as a messenger ribonucleoprotein between microtubules and polyribosomes. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. January, p. 105–114, 2008.

WEILER, I. J. *et al.* Fragile X mental retardation protein is necessary for neurotransmitter-activated protein translation at synapses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 50, p. 17504–9, 14 dez. 2004.

WEILER, I. J. J. *et al.* Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 5395, maio 1997.

WENZEL, H. J. *et al.* Ubiquitin-positive intranuclear inclusions in neuronal and glial cells in a mouse model of the fragile X premutation. **Brain research**, v. 1318, p. 155–66, 8 mar. 2010.

WILLEMSEN, R. *et al.* Association of FMRP with ribosomal precursor particles in the nucleolus. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 225, n. 1, p. 27–33, 5 ago. 1996.

XIE, W. *et al.* Tissue and developmental regulation of fragile X mental retardation 1 exon 12 and 15 isoforms. **Neurobiology of disease**, v. 35, n. 1, p. 52–62, jul. 2009.

YAN, X.; DENMAN, R. B. Conformational-dependent and independent RNA binding to the fragile x mental retardation protein. **Journal of nucleic acids**, v. 2011, p. 246127, jan. 2011.

YANG, L. *et al.* Fragile X mental retardation protein modulates the fate of germline stem cells in Drosophila. **Human molecular genetics**, v. 16, n. 15, p. 1814–20, 1 ago. 2007.

YANG, Y. *et al.* The bantam microRNA is associated with drosophila fragile X mental retardation protein and regulates the fate of germline stem cells. **PLoS genetics**, v. 5, n. 4, p. e1000444, abr. 2009.

YU, S. *et al.* Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. **Science**, v. 252, n. 5010, p. 1179–1181, 1991.

ZALFA, F. *et al.* The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. **Cell**, v. 112, n. 3, p. 317–327, 2003.

ZALFA, F. *et al.* Fragile X mental retardation protein (FMRP) binds specifically to the brain cytoplasmic RNAs BC1/BC200 via a novel RNA-binding motif. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33403–10, 30 set. 2005.

ZANG, J. B. *et al.* A mouse model of the human Fragile X syndrome I304N mutation. **PLoS genetics**, v. 5, n. 12, p. e1000758, dez. 2009.

ZHANG, J. *et al.* Altered hippocampal synaptic plasticity in the FMR1 gene family knockout mouse models. **Journal of**, v. 101, n. 5, p. 2572–2580, maio 2009.

ZHANG, Y. *et al.* The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. **Embo J**, v. 14, n. 21, p. 5358–5366, 1995.

ZINGEREVICH, C. *et al.* Motor abilities of children diagnosed with fragile X syndrome with and without autism. **Journal of intellectual disability research : JIDR**, v. 53, n. 1, p. 11–8, jan. 2009.