

Documentos

ISSN 1677-9274
Dezembro, 2010

111

A tecnologia de microarranjos na identificação de genes de interesse na bovinocultura



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Informática Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 111

A tecnologia de microarranjos na identificação de genes de interesse na bovinocultura

Poliana Fernanda Giachetto

Embrapa Informática Agropecuária

Av. André Tosello, 209 - Barão Geraldo
Caixa Postal 6041 - 13083-886 - Campinas, SP
Fone: (19) 3211-5700 - Fax: (19) 3211-5754
www.cnptia.embrapa.br
sac@cnptia.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Silvia Maria Fonseca Silveira Massruhá*

Membros: *Poliana Fernanda Giachetto, Roberto Hiroshi Higa, Stanley Robson de Medeiros Oliveira, Maria Goretti Gurgel Praxedes, Adriana Farah Gonzalez, Neide Makiko Furukawa*

Membros suplentes: *Alexandre de Castro, Fernando Attique Máximo, Paula Regina Kuser Falcão*

Supervisor editorial: *Neide Makiko Furukawa*

Revisor de texto: *Adriana Farah Gonzalez*

Normalização bibliográfica: *Maria Goretti Gurgel Praxedes*

Editoração eletrônica/Arte capa: *Suzilei Almeida Carneiro*

Fotos da capa: *Imagens livres disponíveis em <<http://www.stock.schng>>*

Secretária: *Carla Cristiane Osawa*

1ª edição on-line 2010

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Informática Agropecuária

Giachetto, Poliana Fernanda.

A tecnologia de microarranjos na identificação de genes de interesse na bovinocultura / Poliana Fernanda Giachetto. - Campinas : Embrapa Informática Agropecuária, 2010.

35 p. : il. - (Documentos / Embrapa Informática Agropecuária ; ISSN 1677-9274, 111).

1. Tecnologia de microarranjos. 2. Expressão gênica. 3. Bovinocultura. I. Título. II. Série.

CDD 572.865 (21. ed.)

© Embrapa 2010

Autor

Poliana Fernanda Giachetto

Doutora em Produção Animal

Pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária

Av. André Tosello, 209, Barão Geraldo

Caixa Postal 6041 - 13083-970 - Campinas, SP

Telefone: (19) 3211-5813

e-mail: poliana@cnptia.embrapa.br

Apresentação

Como ferramenta de análise da expressão gênica, a tecnologia dos microarranjos de DNA permite a investigação de milhares de transcritos de um tecido, de maneira simultânea. Essa metodologia tem revolucionado diversas áreas do conhecimento, por meio do aumento substancial da capacidade analítica dos processos moleculares.

Hoje, dentro da ciência animal, a disponibilidade desse método de investigação tem permitido aos pesquisadores identificar variações na expressão de determinados genes que possam ocorrer como respostas biológicas devido à condição experimental (idade, raça, estado fisiológico).

Sob um aspecto prático, essa tecnologia tem seu papel na identificação de genes envolvidos na determinação de características fenotípicas de interesse econômico, os quais podem ser usados no desenvolvimento de métodos para a seleção de genótipos superiores dentro dos programas de Melhoramento Genético. Esse é um dos motivos de sua adoção em um dos projetos que compõe a carteira dos Macroprogramas da Embrapa, o MP1 Rede Genômica Animal.

Assim, esta publicação tem como propósito posicionar o leitor a respeito da contribuição que a tecnologia de microarranjos de expressão tem trazido com respeito à identificação de genes e processos biológicos que atuam na manifestação de características de interesse econômico, em especial na bovinocultura. Além disso, pretende despertar o interesse da comunidade científica para uma área que ainda demanda muita pesquisa e à qual a Embrapa Informática Agropecuária tem dedicado um grande esforço: a análise dos dados gerados dos experimentos com microarranjos da Rede Genômica Animal.

Kleber Xavier Sampaio de Souza

Chefe Geral

Embrapa Informática Agropecuária

Sumário

A tecnologia de microarranjos	9
Em que consistem os microarranjos de DNA?	10
Etapas de um experimento com microarranjos	11
Análise dos dados.....	12
Estudos de microarranjos na identificação de genes de importância econômica para a bovinocultura	15
Considerações finais	26
Referências	27

A tecnologia de microarranjos na identificação de genes de interesse na bovinocultura

Poliana Fernanda Giachetto

A tecnologia de microarranjos

O sequenciamento do genoma humano e de outros organismos veio acompanhado de grandes avanços metodológicos e científicos na biologia e na genética molecular. Dentre as novas tecnologias desenvolvidas, como um dos desdobramentos do sequenciamento dos genomas, destaca-se a técnica de microarranjos de DNA. Como ferramenta para o estudo da expressão gênica, desde 1995, quando Schena e colaboradores (SCHENA et al., 1995) demonstraram o uso de um microarranjo de cDNA na análise quantitativa do transcriptoma de várias linhagens e órgãos de *Arabidopsis thaliana*, a tecnologia passou a ser largamente utilizada em diversas abordagens da medida nos níveis de transcrição dos genes. Diferente das metodologias existentes até então, essa técnica passou a permitir a investigação de milhares de transcritos de maneira simultânea, o que revolucionou diversas áreas da biologia, por meio do aumento substancial da capacidade analítica dos processos moleculares.

Essencialmente, os microarranjos de DNA podem ser usados para analisar qualquer tipo de variação na expressão gênica entre amostras, sejam estas diferenças naturais ou induzidas. Hoje, dentro da ciência animal, a disponibilidade desse novo método de investigação tem permitido aos pesquisadores examinar comparativamente a expressão gênica global que

ocorre em diferentes tipos celulares ou em um tecido específico, quando submetido ou exposto a diferentes condições experimentais. Esse tipo de análise permite identificar variações na expressão de determinados genes que possam ocorrer como respostas biológicas naturais devido à condição experimental (idade, raça, estado fisiológico) à qual a amostra em estudo foi submetida.

Com o uso dessa técnica, podemos mover o foco dos estudos da caracterização de mecanismos e processos individuais, em direção à análise e investigação de sistemas biológicos como um todo, ao integrar dados e trabalhar com uma visão mais abrangente e, conseqüentemente, mais próxima da complexidade dos organismos.

Em que consistem os microarranjos de DNA?

Os microarranjos, ou *chips* de DNA, em alusão ao componente eletrônico que carrega milhões de transistores, são lâminas sólidas, nas quais fragmentos de DNA fita simples, denominados de sondas, são depositados e imobilizados de forma ordenada e em áreas específicas, chamadas de *spots*. Na lâmina, cada *spot* contém milhões de cópias de um único e determinado transcrito que pode posteriormente ser identificado. O princípio da técnica baseia-se na hibridização por complementaridade das moléculas de ácido nucleico, que ocorre entre a sonda depositada na lâmina e o seu RNAm correspondente, transformado em cDNA, extraído das amostras a serem analisadas e comparadas.

Os microarranjos de DNA evoluíram, por assim dizer, a partir da técnica de *dot blot*, partindo da análise de poucos genes e utilizando, como suporte, membranas porosas (náilon, nitrocelulose), progredindo pela miniaturização e automatização, o que permitiu que a hibridização pudesse ser usada em larga escala na exploração dos dados gerados pelos projetos genoma. O desenvolvimento de duas áreas foi fundamental para a evolução da técnica: o surgimento de sistemas robotizados que permitiram a elaboração de lâminas com alta densidade de *spots* e a otimização de métodos de detecção da fluorescência, que atingiram a sensibilidade necessária para as medidas de intensidade geradas pelos fluoróforos.

Etapas de um experimento com microarranjos

Basicamente, são três as etapas envolvidas em um experimento com microarranjos: (a) preparo das amostras, (b) hibridização e (c) detecção, visualização e interpretação dos dados.

No caso da hibridização comparativa (ou competitiva), que envolve a utilização de duas amostras simultaneamente, a população de RNA total ou RNAm é isolada do tecido ou célula alvo da amostra teste (amostra a ser investigada) e da amostra referência (amostra usada para comparação). Em seguida, o RNA das amostras é convertido a cDNA, por meio de transcrição reversa (pela ação da transcriptase reversa) e marcado com dois corantes fluorescentes diferentes. Embora haja vários tipos de corantes fluorescentes disponíveis comercialmente, nucleotídeos (dUTP ou dCTP) marcados com as cianinas 3 e 5 (conhecidos como Cy3 e Cy5) têm sido os mais utilizados para esse propósito. Esses corantes, incorporados aos cDNAs durante a transcrição reversa, possuem espectros de emissão e excitação diferentes, o que permite que as amostras teste e referência sejam individualmente quantificadas após a hibridização. Após o processo de hibridização, as lâminas são lavadas para a remoção dos cDNAs que não se ligaram às sondas e, em seguida, expostas à ação de raios laser que excitam os corantes, fazendo com que estes emitam luz (fluorescência). Cada *spot* de uma lâmina de microarranjo representa o valor da atividade transcricional de um determinado gene em uma situação biológica de interesse. Esses valores de atividade gênica são codificados em forma de sinais de intensidade, gerados pelos fluoróforos incorporados ao cDNA. Nessas etapas, a qualidade do RNA extraído, assim como a eficiência de incorporação dos nucleotídeos fluorescentes nas moléculas são aspectos bastante importantes, existindo, na literatura, vários trabalhos que visam à otimização desses passos para a obtenção de resultados mais robustos e o uso mais eficiente dos experimentos de microarranjos (KHODAREV et al., 2002; LAGE et al., 2002; NADERI et al., 2004; NAGAI; CHAPMAN JUNIOR, 2002).

Existem variações na técnica, relacionadas, principalmente, à fabricação das lâminas e modo de detecção do sinal gerado. As lâminas podem ter as sondas depositadas sobre sua superfície (*spotted array*), por meio de um robô de alta precisão ou podem ser diretamente sintetizadas sobre ela

(*oligo arrays*), por meio do processo de fotolitografia. No primeiro caso, as amostras utilizadas podem ser cDNAs obtidos a partir de clones de bibliotecas de cDNA, produtos da amplificação por meio de PCR ou oligonucleotídeos pré-sintetizados. No processo de fotolitografia, são sintetizados oligonucleotídeos com tamanhos variando em torno de 25pb (curtos) a 80pb (longos). Microarranjos de uma cor ou um canal utilizam somente um fluoróforo para marcação e requerem hibridizações separadas das amostras controle e referência.

Os dados originais obtidos como resultado de um experimento com microarranjos são imagens, que representam os níveis de expressão dos genes presentes no suporte sólido, e que devem ser analisadas por um programa específico de análise de imagens. Esse programa gera uma tabela de dados numéricos contendo os valores de intensidade dos *spots* e seus respectivos valores de intensidade do *background* local (ruído). A etapa de aquisição de imagem é extremamente importante, uma vez que toda a análise posterior depende desse processo. Em seguida, esses dados devem ser processados, e uma análise exploratória deve ser empregada visando à identificação de efeitos sistemáticos que devem ser removidos por meio de métodos de normalização adequados. A normalização ajusta as diferenças nas eficiências de marcação e de detecção dos corantes e também na quantidade inicial de RNA das amostras em estudo. Uma vez feito isso, tem-se um conjunto de dados que pode ser denotado por uma matriz de valores numéricos que representam os níveis de expressão dos diferentes genes da lâmina em uma variedade de condições biológicas.

Análise dos dados

Os métodos mais comumente empregados na análise dos dados de microarranjos são a construção de agrupamentos (para genes e amostras), a busca de genes diferencialmente expressos e a busca por grupos de genes capazes de discriminar tipos biológicos diferentes (análise de classificação ou discriminatória).

Na análise de dados de expressão gênica, o agrupamento é considerado um passo chave, porque viabiliza a detecção de grupos de genes que exibem padrões de expressão similares (coexpressos ou corregulados)

ou que mostram expressão diferencial. Baseado em nosso conhecimento dos processos celulares, sabe-se que genes contidos em uma via particular ou que respondem a estímulos externos comuns podem ser coregulados, e, conseqüentemente, mostrar padrões similares de expressão (QUACKENBUSH, 2001). A construção de agrupamentos a partir de dados numéricos observados experimentalmente encontra-se em uma área da estatística denominada de análise multivariada, e consiste em um método para agrupar os dados de acordo com uma medida de similaridade. De acordo com Esteves (2007), no contexto da análise dos microarranjos, a análise de agrupamentos pode ser entendida como o processo de reunir entidades similares entre si, sendo que essas entidades podem ser os genes ou as amostras biológicas estudadas. O agrupamento baseia-se em medidas de similaridade, ou métricas, que nada mais são do que fórmulas matemáticas que calculam um número positivo a partir de dois pontos do seu espaço de entidades, no caso representadas pelo nível de expressão dos genes. Atualmente, a distância euclidiana e a medida de correlação têm sido métricas bastante utilizadas em análises de agrupamentos de dados de expressão gênica. Dentre os diferentes algoritmos existentes, e há uma série deles, pode-se citar o agrupamento hierárquico, o k -médias, e o *Self-Organizing Maps* (SOM), como os mais utilizados.

O agrupamento hierárquico, inicialmente proposto para análise de microarranjos por Eisen et al. (1998), é um procedimento aglomerativo que consiste em agrupar as entidades de menor distância. No início, cada entidade representa um grupo. O par mais próximo é identificado constituindo um novo grupo. As distâncias entre esse novo grupo e as entidades restantes são calculadas, até que todos os elementos tenham sido agrupados. Esse método tem a vantagem de ser simples e o resultado pode ser facilmente visualizado. O uso desse algoritmo resulta na criação de uma árvore hierárquica (dendrograma), onde as folhas representam as entidades estudadas (genes ou amostras biológicas) e a raiz, o ponto de convergência dos galhos da árvore. O k -médias (TAVAZOIE et al., 1999) é um dos algoritmos mais rápidos e simples que existe, sendo um dos mais utilizados para o agrupamento dos dados de expressão gênica, juntamente com o hierárquico. Nesse caso, é indicado o número de grupos desejado (essa é uma limitação, pois é necessário saber o número de grupos) e o algoritmo cria um conjunto inicial de grupos. A seguir, o centroide de cada um desses grupos é calculado e o algoritmo analisa a distância ou similaridade desses centroides com todos os elementos a serem agrupados;

cada objeto é então alocado ao grupo cujo centroide esteja mais próximo e, ao ser incluído, esse centroide é recalculado para representar esse novo objeto. O processo é repetido até que os centroides não mudem mais de posição. O algoritmo SOM é um dos mais populares de rede neural artificial, frequentemente utilizado para tarefas de agrupamento e visualização. A primeira aplicação para análise de dados de expressão gênica foi feita por Tamayo et al. (1999). É similar ao método de k -médias, onde um número pré-definido de grupos é especificado. No entanto, nesse método, os grupos são relacionados a outros por meio de uma topologia espacial, geralmente arranjados em uma grade quadrada ou hexagonal, onde, inicialmente, os elementos são alocados aos seus grupos aleatoriamente. O algoritmo iterativamente recalcula os centroides dos grupos baseado nos elementos de cada um, assim como aqueles elementos da vizinhança, e então realoca os elementos aos grupos. Uma vez que os grupos estão espacialmente relacionados, grupos vizinhos podem geralmente ser unidos ao final de uma iteração, baseado num valor previamente estabelecido. De acordo com Quackenbush (2001), embora os métodos de análise de agrupamento sejam bem definidos e reproduzíveis, eles podem ser subjetivos, uma vez que, selecionando-se diferentes algoritmos, normalizações ou distâncias métricas, diferentes objetos podem ser alocados em diferentes grupos; ainda, agrupamentos podem ser formados com dados não relacionados, sem nenhum significado biológico. O desafio é selecionar os dados e aplicar o algoritmo apropriado.

Embora as análises de agrupamento permitam a identificação de padrões coerentes de expressão gênica, ela gera pouca informação a respeito da significância estatística (EISEN et al., 1998), e um dos principais objetivos da análise de dados de microarranjos é a identificação de genes com diferenças significativas de expressão entre as amostras biológicas estudadas. Historicamente, a identificação de genes diferencialmente expressos era feita com base na razão entre os valores de intensidade normalizada para as 2 amostras biológicas estudadas, usando-se um ponto de corte arbitrário para classificar o gene como diferencialmente expresso ou não. Com a utilização de réplicas biológicas, o mesmo tipo de análise era feito, utilizando-se a razão entre as médias das réplicas biológicas estudadas. Atualmente, modelos estatísticos têm sido usados para este tipo de análise diferencial. A ideia principal é descobrir quais genes do conjunto de dados apresentam diferenças significativas de expressão entre as condições biológicas estudadas. Quando a avaliação é feita entre apenas 2 condi-

ções biológicas diferentes, utilizam-se modelos estatísticos mais simples que buscam diferenças significativas entre medidas de posição central dos dois grupos, como o teste *t*. Quando mais de duas amostras biológicas são estudadas, modelos mais elaborados são utilizados, como modelos de análise de variância (Anova). Um outro método, descrito por Tusher et al. (2001) e denominado de *Significance Analysis of Microarrays* (SAM), também tem sido bastante adotado. Nele, é atribuído um valor a cada gene, com base na mudança relativa de sua expressão e o desvio padrão dessa mudança; genes com valores maiores do que um limiar são considerados significativos.

Uma outra abordagem adotada na análise dos dados de expressão gênica, a classificação, ou discriminação, tem como objetivo principal classificar os diferentes tipos de amostras biológicas estudadas, com base no perfil de expressão de um pequeno grupo de genes. Várias metodologias podem ser usadas nesse tipo de análise (DUDOIT et al., 2002) sendo mais utilizado o método dos *k*-vizinhos, o discriminante linear de Fisher e as máquinas de vetores-suporte (*Support Vector Machines* - SVM).

Estudos de microarranjos na identificação de genes de importância econômica para a bovinocultura

A tecnologia dos microarranjos trouxe uma contribuição importante à biologia molecular, com relação aos estudos de expressão gênica. De acordo com Hoheisel (2006), essa metodologia mudou o sentido do estudo de funções biológicas individuais acerca de um ou poucos genes relacionados, na direção de investigações globais a respeito da atividade celular, o que talvez seja o seu grande diferencial. O desenvolvimento dessa técnica rapidamente produziu novas e interessantes estimativas a respeito de transcritomas, e tem gerado um número substancial de dados para análise.

No entanto, apesar de todo o potencial evidenciado, a aplicação da metodologia de microarranjos ainda encontra desafios a serem vencidos. É frequente, na literatura, a etapa de análise dos dados gerados pelos experimentos ser apontada como uma das maiores dificuldades da técnica. Embora alguns padrões tenham sido estabelecidos, ainda há muito

a ser melhorado com respeito à interpretação dos resultados. Apesar de a aquisição da imagem ser um processo bastante avançado dentro da metodologia, a filtragem dos dados é feita de acordo com a experiência de cada pesquisador, o que pode levar a discrepâncias logo no início das análises e não permitir um alto grau de reprodutibilidade dos experimentos, além de tornar difícil a comparação dos dados (LARKIN et al., 2005; YANG; SPEED, 2002). De acordo com Bendixen et al. (2005) e Larkin et al. (2005), o estabelecimento de protocolos e rotinas comuns é uma necessidade, uma vez que tornará mais fácil e permitirá uma melhor avaliação e comparação dos dados gerados pelos microarranjos.

No sentido de garantir o uso de protocolos e rotinas comuns, em uma iniciativa internacional, a Microarray Gene Expression Data Society (MGED), foi constituída, em 1999, com a tarefa de facilitar a utilização dos dados gerados por experimentos com microarranjos e outras tecnologias genômicas, por meio do estabelecimento de padrões de qualidade, gerenciamento, anotação e compartilhamento dos dados gerados. Até o momento, a sociedade definiu padrões sobre as informações mínimas necessárias que devem ser registradas em um banco de dados de microarranjos (Minimum Information About a Microarray Experiment - Miame, BRAZMA et al., 2001) e padrões sobre a terminologia a ser usada nos experimentos (MGED Ontology). Foi estabelecido também, pelo Object Management Group (OMG), um modelo para representação dos dados, o Microarray and Gene Expression (Mage) (Spellman et al., 2002). Essa padronização visa permitir a reprodução do experimento, a validação dos resultados relatados e facilitar a comparação entre experimentos similares.

Atualmente, o uso de microarranjos na genotipagem e na análise de perfis transcricionais tem avançado no sentido de se tornar uma técnica rotineira para esses fins. No entanto, a adaptação da metodologia e a combinação com outras técnicas têm possibilitado a adoção da tecnologia de microarranjos em vários outros tipos de estudos. A Tabela 1, descrita em Hoheisel (2006), relata uma série de análises cuja tecnologia de microarranjos tem se mostrado promissora.

Tabela 1. Processos baseados em microarranjo.

Processo*	Situação
Mapeamento de DNA	Avançado
Genotipagem	Avançado, mas ainda em desenvolvimento
Perfis transcricionais	Avançado, mas ainda em desenvolvimento
Análise de variantes de <i>splicing</i>	Em progresso
<i>ChIP-on-chip</i>	Em progresso
CGH baseado em <i>chip</i>	Em progresso
Re-sequenciamento	Em progresso
Ligação de proteína	Em desenvolvimento
Estudos epigenéticos	Em desenvolvimento
Sequenciamento em larga escala	Em desenvolvimento
Interações proteína-DNA	Em desenvolvimento
Tradução <i>on-chip</i>	Em desenvolvimento
Microarranjo universal	Em desenvolvimento
Identificação de <i>exons</i> desconhecidos	Estágios iniciais
Síntese de genes/genomas	Estágios iniciais
Análise da estrutura do DNA	Piloto
Síntese de RNA/iRNA	Piloto
Interações proteína-RNA	Idéia inicial

*Ordenado do mais para o menos avançado. ChIP: imunoprecipitação de cromatina; CHG: hibridização genômica comparativa; iRNA: interferência de RNA.

Fonte: Adaptado de Hoheisel (2006).

Na produção animal, os perfis transcricionais obtidos por meio dessa técnica têm sido úteis na elucidação das vias metabólicas características de tecidos doentes e sadios (HANSSON et al., 2004), na resposta a uma variedade de antígenos (MEADE et al., 2008), na identificação de vias críticas para o desenvolvimento animal (HAMATANI et al., 2004) e na predição de características complexas, como o comportamento animal (WHITFIELD et al., 2003). De acordo com Everts et al. (2005), os perfis de expressão gênica têm o potencial de aumentar dramaticamente nosso conhecimento da fisiologia durante situações de saúde e doença, principalmente com relação a doenças em que há falta de um animal modelo apropriado. Outras

áreas potenciais para o uso da tecnologia de microarranjos incluem sua aplicação no diagnóstico de doenças, na formulação de rações melhoradas para animais de diferentes idades e estados fisiológicos e elevada taxa de melhoramento genético.

Nesse sentido, a tecnologia de microarranjos tem contribuído para o detalhamento do perfil de expressão gênica em vários animais de interesse econômico, como suínos (CHEON et al., 2005; TSAI et al., 2006; ZHAO et al., 2005), coelhos (POPP et al., 2007), aves (AFRAKHTEE; SCHULTHEISS, 2004; BLISS et al., 2005; BURNSIDE et al., 2005; COGBURN et al., 2003; LI et al., 2008; NEIMAN et al., 2001; SARSON et al., 2007; SMITH et al., 2006; VAN HEMERT et al., 2003; WANG et al., 2006) e ovinos (WATKINS et al., 2008). Em bovinos, uma série de trabalhos relatando a utilização de microarranjos, em diferentes contextos, que variam desde o perfil da expressão gênica em tecidos distintos, análise de qualidade da carne, gestação e desenvolvimento fetal, além de respostas imunes, é descrita em Everts et al. (2005). Dada a importância do entendimento da interação patógeno-hospedeiro, para o desenvolvimento de estratégias de controle, McGuire e Glass (2005) revisaram estudos que utilizaram a tecnologia de microarranjos para avaliar, em bovinos, a resposta de macrófagos, células que desempenham um papel central na resposta imune inata e adaptativa. De 2005 pra cá, muitos outros trabalhos surgiram, resultado da utilização de microarranjos bovinos (JENSEN et al., 2006; LI et al., 2006; LUTZOW et al., 2008; MEADE et al., 2008; SMITH et al., 2009; SUGIMOTO et al., 2006; TAN et al., 2006; TAO; MALLARD, 2007; WANG et al., 2009a, 2009b).

A mastite, uma infecção da glândula mamária de origem bacteriana, é considerada um dos maiores problemas da pecuária leiteira mundial, uma vez que reduz a quantidade e qualidade do leite e aumenta os custos com relação aos aspectos sanitários dos animais. Em função da importância econômica e dos ganhos genéticos que ainda não puderam ser obtidos pelos métodos de seleção tradicional, a genética molecular tem concentrado esforços na busca de genes envolvidos no mecanismo de resistência à doença, o que poderia direcionar e tornar mais efetivas as estratégias de melhoramento genético. Na tentativa de estabelecer as interações entre os genes e sua regulação na resposta à infecção e doenças, vários resultados têm sido obtidos por meio do uso da técnica de microarranjos.

Lutzow et al. (2008), utilizando o microarranjo produzido por Donaldson

et al. (2005) - *Bovine Innate Immune Microarray*, identificaram uma série de genes ativados no tecido mamário de vacas, em resposta ao desafio contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, um dos principais agentes causadores da mastite em bovinos. Foi verificado, pelos autores, que a maior parte dos genes, super expressos em resposta à infecção, codificava proteínas envolvidas na sinalização celular, principalmente citocinas e quimocinas, moléculas intimamente associadas a processos inflamatórios. Dentre esses, 2 genes codificando para proteínas pouco conhecidas, *S100A12* e *PTX3*, também mostraram expressão induzida pela infecção; análises mais profundas a respeito da função desses genes resultou na indicação das proteínas por eles codificadas como possíveis candidatas ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento e prevenção da mastite. Swanson et al. (2009), utilizando um microarranjo de cDNA contendo aproximadamente 22.000 seqüências, avaliaram as alterações no perfil transcricional do tecido mamário de vacas infectadas com *Streptococcus uberis*, e relataram a superexpressão de genes relacionados à resposta imune, morte celular programada e estresse oxidativo, enquanto genes que codificam as principais proteínas do leite tiveram seu nível de RNAm reduzido. Sugimoto et al. (2006), na busca por genes envolvidos na resposta de resistência de vacas à mastite, utilizaram a técnica de microarranjos em uma outra abordagem. Os autores transfectaram células animais com 2 genes, FEZL e SEMA5A, identificados como envolvidos no mecanismo de resistência à mastite e hibridizaram um microarranjo de seqüências humanas (*Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips*). Como resultado, foram identificados 2 genes da via de ativação da resposta à doença, relacionada ao fator de transcrição FEZL, até então desconhecidos.

O perfil transcricional de macrófagos bovinos estimulados com interferon- γ e lipopolissacarídeo foi relatado por Jensen et al. (2006), utilizando um microarranjo específico de macrófagos bovinos (BoMP). Nesse trabalho, foram identificados os genes diferencialmente expressos em tempos crescentes pós-indução, contribuindo para a caracterização da resposta imune em diferentes fases, após a estimulação por um patógeno. A mesma motivação levou Watkins et al. (2008) a analisarem o perfil transcricional de macrófagos bovinos estimulados com interferon- γ e lipopolissacarídeo, em comparação ao de macrófagos não estimulados. Hibridizando o mesmo microarranjo de macrófagos (BoMP) com células provenientes de duas raças bovinas, uma tolerante e outra susceptível (*Bos indicus* e *Bos taurus*,

respectivamente), infectadas *in vitro* com o protozoário *Theileria annulata*, Jensen et al. (2008) encontraram uma série de genes diferencialmente expressos e específicos de cada genótipo. O trabalho indicou diferenças entre macrófagos inerentes à raça, quando comparados os dois extremos, um tolerante e outro susceptível; o estudo desses genes pode fornecer informações importantes sobre a resposta à infecção com *T. annulata*, que poderão ser usadas em programas de melhoramento genético visando ao aumento da tolerância ao parasita.

Trabalhos como os citados acima são bastante importantes para o entendimento da resposta do hospedeiro à invasão por patógenos de maneira geral, evidenciando genes que podem ser estudados em programas de melhoramento genético que envolvam a aquisição de resistência pelos animais.

Ainda tratando-se da descoberta de genes relacionados à resistência (ou tolerância) do hospedeiro, uma série de investigações foram realizadas por Piper et al. (2008, 2009, 2010), com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos na resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus microplus*. Nos países tropicais, o prejuízo causado pela infestação dos rebanhos bovinos pelo carrapato tem gerado um grande impacto nos sistemas de produção. A redução no peso e a piora na conversão alimentar, juntamente com as doenças transmitidas pelo parasita, levam a perdas econômicas da ordem de bilhões de dólares todos os anos.

De maneira geral, bovinos da subespécie zebuína *Bos taurus indicus* são menos susceptíveis à infestação com *R. microplus* do que os animais da subespécie taurina, *Bos taurus taurus*. No entanto, as bases imunológicas por trás dessa diferença ainda não são conhecidas, de modo que um grande esforço tem sido dispensado na busca das vias biológicas e dos genes que elicitam essa resposta de maneira distinta nesses animais.

Apoiados nesse modelo de estudo, raça taurina vs raça zebuína, e utilizando a plataforma *GeneChip® Bovine Genome Array* da Affymetrix, os autores (Piper et al., 2009) identificaram 497 genes diferencialmente expressos nas células brancas do sangue entre as raças bovinas Brahman e Holstein, consideradas mais e menos resistentes à infestação pelo parasita, respectivamente. Foi verificado que grande parte desses genes pertencem a duas grandes categorias principais: genes envolvidos com resposta imune adaptativa e genes envolvidos em processos metabólicos. Análises baseadas em ontologia (utilizando *Gene Ontology*) e vias metabólicas (banco de da-

dos KEGG), a partir dos genes mais expressos em cada raça, juntamente com medidas de parâmetros celulares realizadas nesses animais (medida da população de células mononucleares no sangue periférico, expressão de citocinas pelos leucócitos e níveis de anticorpos para imunoglobulinas G1 (IgG1) carrapato-específicas), levaram os autores a sugerir o desenvolvimento, por parte dos bovinos da raça Brahman, de uma resposta à infestação por carrapatos predominantemente mediada por células-T, enquanto que os animais Holstein demonstraram um perfil celular consistente com uma resposta inata, do tipo anti-inflamatória. No estudo posterior (PIPER et al., 2010), também foi verificada expressão diferencial na pele de bovinos Brahman e Holstein infestados com *R. microplus*. Genes envolvidos em processos inflamatórios e resposta imune foram super expressos em animais Holstein. Já nos bovinos Brahman foi verificada uma super expressão de genes que codificam constituintes da matriz extracelular.

Dada a importância do entendimento do papel de genes na determinação da qualidade da carne, estudos de expressão gênica utilizando microarranjos têm sido conduzidos com o objetivo de identificar genes candidatos a alvos para futuros testes baseados em hipóteses e posteriormente serem utilizados em estratégias de seleção de animais com características superiores para esse atributo.

Dentre os vários componentes que afetam a qualidade da carne, a gordura (quantidade e distribuição) tem grande importância, uma vez que está diretamente relacionada ao sabor, à maciez e à suculência, características bastante valorizadas pelo consumidor. Com o objetivo de avaliar as alterações que ocorrem durante o processo de adipogênese, Tan et al. (2006) usaram o microarranjo para buscar genes diferencialmente expressos em células da medula óssea de bovinos, submetidas ou não à ação de agentes adipogênicos.

Juntamente com a idade e a nutrição, o componente genético é altamente determinante na deposição de gordura intramuscular na carcaça animal. Assim, experimentos que comparam o perfil transcricional entre raças com diferentes potenciais de deposição de gordura intramuscular trazem informações importantes acerca de genes diferencialmente expressos que podem, por exemplo, ser usados como genes candidatos nos programas de melhoramento de gado de corte. Wang et al. (2009a) avaliaram o transcriptoma da gordura intramuscular de 2 cruzamentos bovinos contrastantes quanto a essa característica, em diferentes idades, e observaram 97

genes diferencialmente expressos. Uma maior expressão de genes relacionados à adipogênese e à lipogênese foi verificada nos animais com alto potencial para deposição de gordura intramuscular, enquanto que genes associados à atividade oxidativa mitocondrial foram mais expressos nos animais com baixa gordura intramuscular. Os autores identificaram, ainda, genes diferencialmente expressos entre os 2 cruzamentos a partir dos 7 meses, idade em que a deposição da gordura intramuscular ainda não é morfológicamente distinta de maneira significativa, sugerindo a utilização desses genes como biomarcadores. Outro tipo de gordura da carcaça, a gordura subcutânea, também é bastante importante em termos de qualidade de carne, uma vez que preserva-a durante o processo de resfriamento. Taniguchi et al. (2008) compararam os perfis transcricionais do tecido adiposo subcutâneo de bovinos de 2 cruzamentos, com diferentes espessuras de gordura, e identificaram 360 genes diferencialmente expressos, sugerindo a influência do genótipo no metabolismo da gordura. Desses genes, 6 tiveram a expressão correlacionada com a espessura da gordura subcutânea.

Kee et al. (2008) utilizaram o *GeneChip® Bovine Genome Array* da Affymetrix para obter o transcriptoma do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos e identificaram marcadores transcricionais para características de carne. Correlacionando os genes expressos no músculo com características medidas de suculência e maciez (força de cisalhamento, capacidade de retenção de água, perda após o cozimento) e também de rendimento (área de olho de lombo) da carne, os autores mostraram que cada característica de qualidade pode ser definida por um padrão de expressão gênica específico.

Dentro do contexto de melhoria da eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos, um melhor entendimento dos eventos celulares e moleculares que permeiam o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos poderia certamente resultar na descoberta de genes alvos para o desenvolvimento de novas estratégias. Nesse sentido, uma série de resultados de experimentos utilizando microarranjos já foram publicados comparando-se perfis transcricionais de diferentes tecidos, estágios de desenvolvimento e condições fisiológicas, gerando informações interessantes e abrindo caminho para novos estudos. Em Evans et al. (2008), pode ser encontrada uma série de microarranjos disponíveis para estudos relacionados à reprodução em bovinos. Lingenfelter et al. (2008), utilizando um microarranjo contendo 8.329 genes

bovinos, compararam o perfil de expressão gênica das células da granulosa de folículos em crescimento e de folículos persistentes, os quais estão relacionados à maior incidência de perda embrionária após ovulação e fertilização. Nesses últimos, os autores encontraram uma expressão alterada de genes relacionados ao metabolismo protéico e energético, transporte de aminoácidos e apoptose, sugerindo uma baixa capacidade das células da granulosa em fornecer energia e aminoácidos aos oócitos nessa situação. Zielak et al. (2008) avaliaram a expressão diferencial de genes de fatores de transcrição nas células da granulosa e da teca de folículos dominantes e subordinados, e identificaram 5 novos genes codificando para fatores de transcrição que foram superexpressos nos folículos subordinados. Esse tipo de estudo com fatores de transcrição é bastante importante para o entendimento das cascatas regulatórias e também na identificação de candidatos alvo para o melhoramento genético via transgenia, uma vez que a expressão desses genes regula a expressão de vários outros da mesma via metabólica, o que contribui para que o efeito desejado no fenótipo seja obtido.

No mesmo sentido, Forde et al. (2008) avaliaram a expressão de genes envolvidos no processo de transdução de sinais durante o desenvolvimento de folículos ovarianos, identificando diferenças relacionadas ao estágio de crescimento dos mesmos. Smith et al. (2009), utilizando um microarranjo bovino com cDNAs provenientes de bibliotecas de baço e placenta (Everts et al., 2005), compararam o perfil de expressão de blastocistos que passaram por diferentes fases de produção *in vitro*. O objetivo foi identificar genes envolvidos na Síndrome do Bezerro Grande (Large Offspring Syndrome - LOS), caracterizada por alterações fenotípicas observadas durante a gestação e no recém-nascido, como distúrbios placentários e excesso de peso ao nascimento, que acomete embriões bovinos e ovinos produzidos *in vitro*. Os autores verificaram uma dramática alteração na expressão gênica causada pela produção *in vitro*, que causou uma redução na transcrição de genes relacionados ao metabolismo de RNA, apontando candidatos que podem estar relacionados com a LOS. A eficiência de produção de blastocistos em bovinos utilizando-se oócitos desenvolvidos *in vitro* também é relativamente menor em comparação aos oócitos maturados *in vivo*. Dessa maneira, Katz-Jaffe et al. (2009) compararam o transcriptoma de oócitos bovinos maturados *in vivo* e *in vitro*, identificando 10 genes diferencialmente expressos quando o ambiente de maturação foi alterado para a condição *in vitro*. Os autores sugeriram o uso desses

genes na avaliação da qualidade de oócitos em nível molecular, possibilitando o monitoramento de melhorias nos sistemas de maturação *in vitro*.

Utilizando o microarranjo bovino da Affymetrix, Fair et al. (2007) avaliaram os níveis de expressão gênica em oócitos bovinos maduros e imaturos, com o objetivo de identificar vias associadas com a maturação e desenvolvimento dos mesmos; foram identificados 821 transcritos diferencialmente expressos entre os 2 grupos, além de transcritos únicos de cada estágio de maturação, contribuindo para o entendimento do processo de maturação folicular. O resultado obtido pelos autores complementou o estudo de Dalbies-Tran e Mermillod (2003) que, na ausência de um microarranjo bovino, identificaram genes diferencialmente expressos em oócitos bovinos em diferentes estágios de maturação em um microarranjo com sequências humanas.

A tecnologia do microarranjo de expressão, como já descrito, tornou possível a geração de uma grande quantidade de dados a respeito do nível de transcritos de uma célula, um tecido ou um organismo, os quais podem fornecer uma estimativa sobre os perfis de expressão gênica que caracterizam diferentes situações biológicas. Para que informações possam ser retiradas desses dados, análises computacionais e estatísticas são empregadas. Essas análises permitem, inclusive, que resultados de experimentos distintos sejam reunidos, comparados e analisados, o que amplia, em muito, as possibilidades de obtenção de informação a partir da tecnologia de microarranjo. Análises provenientes de dados integrados de expressão gênica gerados por experimentos independentes (denominadas de meta-análises), têm levado a um crescente número de publicações, concomitante ao número de dados depositados nos bancos públicos.

Uma abordagem que pode ser bastante enriquecida com a integração de dados de diferentes experimentos com microarranjos, aumentando o número de amostras, é a análise de coexpressão. Genes com funções similares podem produzir perfis de expressão também similares ao longo de diversas e distintas condições (EISEN et al., 1998). Assim, baseado em padrões de coexpressão, podemos fazer inferências a respeito de redes gênicas regulatórias e vias metabólicas, baseado no princípio de que genes que possuem mecanismo regulatório comum participam da mesma via (REVERTER et al., 2005). Ainda, apoiado no mesmo princípio, genes com função pouco conhecida ou desconhecidos podem ser preditos quando co-expressos com genes já completamente anotados (EHLTING et al., 2008;

HORAN et al., 2008), sendo uma alternativa à metodologia de anotação via similaridade de sequência e domínio protéico.

Utilizando a abordagem de coexpressão a partir de dados integrados, Reverter et al. (2006) construíram uma rede de coexpressão a partir de dados de microarranjos de músculo bovino, identificando módulos específicos de proteínas estruturais do músculo, matriz extracelular, metabolismo de gordura e síntese protéica, além de agrupamentos de genes que refletem a associação física das proteínas codificadas, como *MYOZ1*, *TCAP* e *PDLIM3*, componentes do disco Z. Em um trabalho recente do mesmo grupo, os autores analisaram dois grupos de dados de microarranjos em bovinos, sendo o primeiro obtido de animais com menor deposição muscular e o segundo de animais que possuem uma mutação no gene *GDF8*, que resulta em maior deposição muscular. Foi verificado que o padrão de coexpressão do *GDF8*, com um gene diferencialmente expresso (*MYL2*), diferiu entre as 2 amostras, e essa coexpressão diferencial levou os autores a identificar a *GDF8* como o fator de transcrição causal da diferença entre as amostras, mesmo com seu nível de expressão não diferindo entre elas. Vale destacar, no entanto, que o papel da *GDF8* no fenótipo em questão já era conhecido, mas foi usado como prova de conceito da metodologia por eles desenvolvida (HUDSON et al., 2009).

Explorando o potencial da metodologia em prever a função de genes desconhecidos, Kumar et al. (2010) puderam inferir, por meio de análise de coexpressão ao longo de 2 grupos de dados de microarranjos de diversos tecidos bovinos, a função de 9 transcritos específicos, previamente identificados em uma biblioteca de cDNA de placenta bovina e utilizados como genes guias. Os autores salientaram a importância desse tipo de análise na identificação de genes, candidatos a experimentos futuros para a determinação de suas funções bioquímica e celular.

Finalizando, à parte da identificação de genes de interesse econômico, onde a tecnologia de microarranjos tem se consolidado em um papel de indiscutível importância, como descrito ao longo dessa publicação, outras abordagens de utilização da técnica também surgem como iniciativas promissoras dentro da bovinocultura. Recentemente, Rijk et al. (2010) investigaram, por meio de microarranjos da plataforma Agilent 44K, as alterações na expressão gênica hepática de bovinos tratados com dehidroepiandrosterona (DHEA), um prohormônio esteróide produzido naturalmente, mas que tem seu uso proibido pela União Européia. Ferramentas estatísticas

aplicadas aos dados identificaram grupos de genes significativamente enriquecidos nos animais tratados, os quais podem ser considerados como biomarcadores, fazendo dos microarranjos de expressão uma técnica promissora a ser utilizada na identificação da utilização desse prohormônio nos rebanhos bovinos.

Considerações finais

Em função da importância econômica de ganhos genéticos que ainda não puderam ser obtidos pelos métodos de seleção tradicional, a genética molecular tem concentrado esforços na busca de genes envolvidos na manifestação de características de interesse na pecuária, o que poderia direcionar e tornar mais efetivas as estratégias de melhoramento genético. Na tentativa de identificar genes e mesmo estabelecer as interações entre eles, as quais resultam na definição dos fenótipos, vários resultados têm sido obtidos por meio do uso da técnica de microarranjos.

Novas metodologias de análise dos dados gerados pelos microarranjos, baseadas na redução da dimensionalidade, construção de redes gênicas e integração dos dados de expressão com dados de marcadores genéticos, que vão além da já estabelecida identificação dos genes diferencialmente expressos entre as amostras, têm permitido uma maior exploração do potencial da técnica, que, como já citado acima, reside no seu caráter global de avaliação da expressão gênica. Essa característica, aliada ao baixo custo e à necessidade de uma infraestrutura computacional modesta, facilmente encontrada nos centros de pesquisa e universidades, certamente irão garantir a utilização da tecnologia de microarranjos por um longo tempo, mesmo com o advento dos sequenciadores de segunda geração, os quais têm aberto possibilidades extraordinárias para o estudo da expressão gênica.

Referências

- AFRAKHTE, M.; SCHULTHEISS, T. M. Construction and analysis of a subtracted library and microarray of cDNAs expressed specifically in chicken heart progenitor cells. **Developmental Dynamics**, v. 230, n. 2, p.290-298, 2004.
- BENDIXEN, C.; HEDEGAARD, J.; HORN, P. Functional genomics in farm animals - microarranjo analysis. **Meat Science**, v. 71, p.128-137, 2005.
- BLISS, T. W.; DOHMS, J. E.; EMARA, M. G.; KEELER, C. L. Gene expression profiling of avian macrophage activation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, n. 3-4, p. 289-299, 2005.
- BRAZMA, A.; HINGAMP, P.; QUACKENBUSH, J.; SHERLOCK, G.; SPELLMAN, P.; STOECKERT, C.; AACH, J.; ANSORGE, W.; BALL, C. A.; CAUSTON, H. C.; GAASTERLAND, T.; GLENISSON, P.; HOLSTEGE, F. C.; KIM, I. F.; MARKOWITZ, V.; MATESE, J. C.; PARKINSON, H.; ROBINSON, A.; SARKANS, U.; SCHULZE-KREMER, S.; STEWART, J.; TAYLOR, R.; VILO, J.; VINGRON, M. Minimum information about a microarranjo experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. **Nature Genetics**, v. 29, n. 4, p.365-371, 2001.
- BURNSIDE, J.; NEIMAN, P.; TANG, J.; BASOM, R.; TALBOT, R.; ARONSZAJN, M.; BURT, D.; DELROW, J. Development of a cDNA array for chicken gene expression analysis. **BMC Genomics**, v. 6, n. 1, p. 13, 2005.
- CHEON, Y.; NARA, T. Y.; BAND, M. R.; BEEVER, J. E.; WALLIG, M. A.; NAKAMURA, M. T. Induction of overlapping genes by fasting and a peroxisome proliferator in pigs: evidence of functional PPAR α in nonproliferating species. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, p. R1525–R1535, 2005.
- COGBURN, L. A.; WANG, X.; CARRE, W.; REJTO, L.; PORTER, T. E.; AGGREY, S. E.; SIMON, J. Systems-wide Chicken DNA microarray, Gene Expression Profiling, and Discovery of Functional Genes. **Poultry Science**, v. 82, p. 939-951, 2003.

DALBIES-TRAN, R.; MERMILLOD, P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 252-61, 2003.

DUDOIT, S.; YANG, Y. H.; CALLOW, M. J.; SPEED, T. P. Statistical methods for identifying genes with differential expression in replicated cDNA microarray experiments. **Statistica Sinica**, v. 12, p.111-139, 2002.

EHLTING, J.; SAUVEPLANE, V.; OLRV, A.; GINGLINGER, J.F.; PROVART, N.J.; WERCK-REICHHART, D. An extensive (co-)expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v. 8, p. 47, 2008.

EISEN, M. B.; SPELLMAN, P. T.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression pattern. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v. 95, p.14863-14868, 1998.

ESTEVEES, G. H. **Métodos estatísticos para a análise de dados de cDNA microarranjo em um ambiente computacional integrado**. 2007. 174 p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

EVANS, A. C. O.; FORDE, N.; O'GORMAN, G. M.; ZIELAK, A. E.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Use of microarray technology to profile gene expression patterns important for reproduction in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42(S.2), n. 9, p. 359-369, 2008.

EVERTS, R. E; BAND, M. R.; LIU, Z. L.; KUMAR, C. G. LIU, L.; LOOR, J. J.; OLIVEIRA, R.; LEWIN, H. A. A 7872 cDNA microarranjo and its use in bovine functional genomics. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.105, p. 235-245, 2005.

FAIR, T.; CARTER, F.; PARK, S.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P. Global gene expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 68(S1), p.S91-S97, 2007.

FORDE, N.; MIHM, M.; CANTY, M. J.; ZIELAK, A. E.; BAKER, P. J.; PARK,

S. D. E.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; COUSSENS, P. M.; IRELAND, J. J.; EVANS, A. C. O. Differential expression of signal transduction factors in ovarian follicle development; a role for betaglycan FIBP in granulosa cells in cattle. **Physiological Genomics**, v. 33, p.193-204, 2008.

HAMATANI, T.; CARTER, M. G.; SHAROV, A. A.; KO, M. S. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. **Developmental Cell**, v. 6, p.117-131, 2004.

HANSSON, A.; HANCE, N.; DUFOUR, E.; RANTANEN, A.; HULTENBY, K.; CLAYTON, D.A.; WIBOM, R.; LARSSON, N.G. A switch in metabolism precedes increased mitochondrial biogenesis in respiratory chain-deficient mouse hearts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v.101, p.3136-3141, 2004.

HOHEISEL, J. D. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p.200-209, 2006.

HORAN, K.; JANG, C.; BAILEY-SERRES, J.; MITTLER, R.; SHELTON, C.; HARPER, J.F.; ZHU, J.; CUSHMAN, J. C.; GOLLERY, M.; GIRKE, T. Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. **Plant Physiology**, v. 147, p.41-57, 2008.

HUDSON, N.J.; REVERTER, A.; DAIRYMPLE, B.P. A differential wiring analysis of expression data correctly identifies the gene containing the causal mutation. **PLoS Computational Biology**, v. 5, p. 5, 2009.

JENSEN, K; TALBOT, R.; PAXTON, E.; WADDINGTON, D.; GLASS, E. J. Development and validation of a bovine macrophage specific cDNA microarray. **BMC Genomics**, v. 7, p. 224, 2006.

JENSEN, K.; PAXTON, E.; WADDINGTON, D.; TALBOT, R.; DARGHOUTH, M.A.; GLASS, E.J. Differences in the transcriptional responses induced by *Theileria annulata* infection in bovine monocytes derived from resistant and susceptible cattle breeds. **International Journal of Parasitology**, v. 38, p.313-325, 2008.

KATZ-JAFFE, M. G.; MCCALLIE, B. R.; PREIS, K. A.; FILIPOVITS, J.;

GARDNER, D. K.; KATZ-JAFFE, M. G. Transcriptome analysis of in vivo and *in vitro* matured bovine MII oocytes. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p.939-946, 2009.

KEE, H. J.; PARK, E. W.; LEE, C. K. Characterization of beef transcripts correlated with tenderness and moisture. *Molecular Cells*, v.25, n.3, p.428-437, 2008.

KHODAREV, N. N.; YU, J.; NODZENSKI, E.; MURLEY, J. S.; KATAOKA, Y.; BROWN, C. K.; GRDINA, D.J.; WEICHSELBAUM, R. R. Method of RNA purification from endothelial cells for DNA array experiments. **Biotechniques**, v. 32, p. 316-320, 2002.

KUMAR, C. G.; EVERTS, R. E.; LOOR, J. J.; LEWIN, H. A. Functional annotation of novel lineage-specific genes using co-expression and promoter analysis. **BMC Genomics**, v. 11, p. 161, 2010.

LAGE, J. M.; HAMANN, S.; GRIBANOV, O.; LEAMON, J. H.; PEJOVIC, T.; LIZARDI, P. M. Microgel assessment of nucleic acid integrity and labeling quality in microarranjo experiments. **Biotechniques**, v. 32, p. 312-314, 2002.

LARKIN, J. E; FRANK, B. C.; GAVRAS, H. Independence and reproducibility across microarranjo platforms. **Nature Methods**, v. 2, p. 337-344, 2005.

LI, R. L.; MEYER, M. J.; VAN TASSELL, C. P.; SONSTEGARD, T. S.; CONNOR, E. E.; VAN AMBURGH, M. E.; BOISCLAIR, Y. R.; CAPUCO, A. V. Identification of estrogen-responsive genes in the parenchyma and fat pad of the bovine mammary gland by microarray analysis. **Physiological Genomics**, v. 27, p. 42-53, 2006.

LI, X.; CHIANG, H.; ZHU, J.; DOWD, S.E.; ZHOU, H. Characterization of a newly developed chicken 44K Agilent microarray. **BMC Genomics**, v. 9, p. 60, 2008.

LINGENFELTER, B. M.; DAILEY, R. A.; INSKEEP, E. K.; VERNON, M. W.; POOLE, D. H.; RHINEHART, J. D.; YAO, J. C. Microarray analysis of gene expression in granulosa cells from persistent follicles in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 405-413, 2008.

LUTZOW, Y. C. S.; DONALDSON, L.; GRAY, C. P.; VUOCOLO, T.; PEARSON, R. D.; REVERTER, A.; BYRNE, K. A.; SHEEHY, P. A.; WINDON, R.; TELLAM, R. L. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 18, 2008.

MCGUIRE, K.; GLASS, E. J. The expanding role of microarranjos in the investigation of macrophage responses to pathogens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, p. 259-275, 2005.

MEADE, K. G.; GORMLEY, E.; O'FARRELLY, C.; PARK, S. D.; COSTELLO, E.; KEANE, J.; ZHAO, Y.; MACHUGH, D. E. Antigen stimulation of peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis* infected cattle yields evidence for a novel gene expression program. **BMC Genomics**, v. 9, p. 447, 2008.

NADERI, A.; AHMED, A. A.; BARBOSA-MORAIS, N. L.; APARICIO, S.; BRENTON, J. D.; CALDAS, C. Expression microarranjo reproducibility is improved by optimising purification steps in RNA amplification and labelling. **BMC Genomics**, v. 5, p. 9, 2004.

NAGAI, T.; CHAPMAN JUNIOR, W. H. Analysis of microliter volumes of dye-labeled nucleic acids. **Biotechniques**, v. 32, p. 356-364, 2002.

NEIMAN, P. E.; RUDDLELL, A.; JASONI, C.; LORING, G.; THOMAS, S. J.; BRANDVOLD, K. A.; LEE, R.; BURNSIDE, J.; DELROW, J. Analysis of gene expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v.98, n.11, p.6378-6383, 2001.

PIPER, E. K.; JACKSON, L. A.; BAGNALL, N. H.; KONGSUWAN, K. K.; LEW, A. E.; JONSSON, N. N. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n. 1-2, p. 110-119, 2008.

PIPER, E. K.; JACKSON, L. A.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. E.; JONSSON, N. N. Tick susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus*

(*Boophilus microplus*) attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 431-441, 2010.

PIPER, E. K.; JONSSON, N. N.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. E.; MOO-LHUIJZEN, P.; VANCE, M. E.; JACKSON, L. A. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 6, n. 7, p.1074-1086, 2009.

POPP, M. P.; LIU, L.; TIMMERS, A.; ESSON, D. W.; SHIROMA, L.; MEYERS, C.; BERCELI, S.; TAO, M.; WISTOW, G.; SCHULTZ, G. S.; SHERWOOD, M. B. Development of a microarranjo chip for gene expression in rabbit ocular research. **Molecular Vision**, v. 13, p.164-173, 2007.

QUACKENBUSH, J. Computational analysis of microarranjo data. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 408-427, 2001.

REVERTER, A.; BARRIS, W.; MCWILLIAM, S. BYRNE, K.A.; WANG, Y.H.; TAN, S.H.; HUDSON, N.; DALRYMPLE, B.P. Validation of alternative methods of data normalization in gene co-expression studies. **Bioinformatics**, v. 21, n. 7, p.1112-1120, 2005.

REVERTER, A.; HUDSON, N. J.; WANG, Y.; TAN, S. H.; BARRIS, W.; BYRNE, K. A.; MCWILLIAM, S. M.; BOTTEMA, C. D. K.; KISTER, A.; GREENWOOD, P. L.; HARPER, G. S.; LEHNERT, S. A.; DALRYMPLE, B. P. A gene coexpression network for bovine skeletal muscle inferred from microarray data. **Physiological Genomics**, v. 28, p.76-83, 2006.

RIJK, J. C. W.; PEIJNENBURG, A. A.; HENDRIKSEN, P. J. M.; HENDE, J. M. V.; GROOT, M. J.; NIELEN, M. W. F. Feasibility of a liver transcriptomics approach to assess bovine treatment with the prohormone dehydroepian-drosterone (DHEA). **BMC Veterinary Research**, 6, p. 44, 2010.

SARSON, A. J.; READ, L. R.; HAGHIGHI, H. R.; LAMBOURNE, M. D.; BRISBIN, J. T.; ZHOU, H. SHARIF, S. Construction of a microarray specific to the chicken immune system: profiling gene expression in B cells after lipopolysaccharide stimulation. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 108-118, 2007.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarranjo. **Science**, v. 270, p. 467-470, 1995.

SMITH, J.; SPEED, D.; HOCKING, P.; TALBOT, R.; DEGEN, W.; SCHIJNS, V.; GLASS, E.; BURT, D. Development of a chicken 5 K microarray targeted towards immune function. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 49, 2006.

SMITH, S. L.; EVERTS, R. E.; SUNG, L.; DU, F.; PAGE, R. L.; HENDERSON, B.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; NEDAMBALE, T. L.; RENARD, J. P.; LEWIN, H. A.; YANG, X.; TIAN, C. Gene expression profiling of single bovine embryos uncovers significant effects of *in vitro* maturation, fertilization and culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, p. 38-47, 2009.

SPELLMAN, P. T.; MILLER, M.; STEWART, J.; TROUP, C.; SARKANS, U.; CHERVITZ, S.; BERNHART, D.; SHERLOCK, G.; BALL, C.; LEPAGE, M.; SWIATEK, M.; MARKS, W. L.; GONÇALVES, J.; MARKEL, S.; IORDAN, D.; SHOJATALAB, M.; PIZARRO, A.; WHITE, J.; HUBLEY, R.; DEUTSCH, E.; SENGER, M.; ARONOW, B. J.; ROBINSON, A.; BASSETT, D.; STOECKERT JUNIOR, C. J.; BRAZMA, A. Design and implementation of microarray gene expression markup language (MAGE-ML). **Genome Biology**, v. 3, n. 9, 2002.

SUGIMOTO, M.; FUJIKAWA, A.; WOMACK, J. E.; SUGIMOTO, Y. Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v. 103, n. 17, p. 6454-6459, 2006.

SWANSON, K. M.; STELWAGEN, K.; DOBSON, J.; HENDERSON, H. V.; DAVIS, S. R.; FARR, V. C.; SINGH, K. Transcriptome profiling of *Streptococcus uberis*-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 117-129, 2009.

TAMAYO, P.; SLONIM, D.; MESIROV, J.; Z. H. U., Q.; KITAREEWAN, S.; DMITROVSKY, E.; LANDER, E. S.; GOLUB, T. R. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

ces of USA, v. 96, p.2907-2912, 1999.

TAN, S. H.; REVERTER, A.; WANG, Y.; BYRNE, K.A; MCWILLIAM, S. M.; LEHNERT, S.A. Gene expression profiling of bovine *in vitro* adipogenesis using a cDNA microarray. **Functional and Integrative Genomics**, v. 6, p. 235-249, 2006.

TANIGUCHI, M.; GUAN, L. L.; BASARAB, J. A; DODSON, M. V.; MOORE, S. S. Comparative analysis on gene expression profiles in cattle subcutaneous fat tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D**, v. 3, p.2 51-256, 2008.

TAO, W.; MALLARD B. Differentially expressed genes associated with *Staphylococcus aureus* mastitis of Canadian Holstein cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 120, p. 201–211, 2007.

TAVAZOIE, S.; HUGHES, J. D.; CAMPBELL, M. J.; CHO, R. J.; CHURCH, G. M. Systematic determination of genetic network architecture. **Nature Genetics**, v. 22, p,281-285, 1999.

TSAI, S.; MIR, B.; MARTIN, A.; ESTRADA, J.; BISCHOFF, S.; HSIEH, W.; CASSADY, J.; FREKING, B.; NONNEMAN, D.; ROHRER, G.; PIEDRAHITA, J. Detection of transcriptional difference of porcine imprinted genes using different microarray platforms. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p.328, 2006.

TUSHER, V. G; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, v.98, n.9, p.5116-5121, 2001.

VAN HEMERT, S.; EBBELAAR, B. H.; SMITS, M. A.; REBEL, J. M. Generation of EST and microarray resources for functional genomic studies on chicken intestinal health. **Animal Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 133-143, 2003.

WANG, H.; LI, H.; WANG, Q, WANG, Y.; HAN, H.; SHI, H. Microarray analysis of adipose tissue gene expression profiles between two chicken breeds. **Journal of Biosciences**, v. 31, n. 5, p. 565-573, 2006.

WANG, Y. H.; BOWER, N. I.; REVERTER, A.; TAN, S. H.; DE JAGER, N.;

WANG, R.; MCWILLIAM, S. M.; CAFÉ, L. M.; GREENWOOD, P. L.; LEHNERT, S. A. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, p.119-130, 2009a.

WANG, Y. Q.; PUNTENNEY, S. B.; BURTON, J. L.; FORSBERG, N. E. Use of gene profiling to evaluate the effects of a feed additive on immune function in periparturient dairy cattle. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, p.66-75, 2009b.

WATKINS, C.; MCKELLAR, A.; JENSEN, K.; GEORGE, A.; JONES, D.; SHARP, M.J.; STEVENSON, K.; HOPKINS, J. Development and validation of an oligonucleotide microarray for immuno-inflammatory genes of ruminants. **Veterinary Research Communications**, v. 32, p.647-657, 2008.

WHIFIELD, C. W.; CZIKO, A. M.; ROBINSON, G. E. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. **Science**, v. 302, p. 296-299, 2003.

YANG, Y. H.; SPEED, T. Design issues for cDNA microarranjo experiments. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 579-88, 2002.

ZHAO, S. H.; RECKNOR, J.; LUNNEY, J. K.; NETTLETON, D.; KUCHAR, D.; ORLEY, S.; TUGGLE, C. K. Validation of a first-generation long-oligonucleotide microarray for transcriptional profiling in the pig. **Genomics**, v. 86, n. 5, p. 618-625, 2005.

ZIELAK, A. E.; CANTY, M. J.; FORDE, N.; COUSSENS, P. M.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; IRELAND, J. J; EVANS, A. C. O. Differential expression of genes for transcription factors in theca and granulosa cells following selection of a dominant follicle in cattle. **Molecular Reproduction Development**, v. 75, n. 5, p .904-914, 2008.

Embrapa

Informática Agropecuária

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE 9127