

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE  
OVELHAS CHURRA  
EM DIFERENTES ESTADOS PRODUTIVOS**



**Tese de Doutoramento  
Ramo Zootecnia**

**Sara Maria de Jesus Freitas Rocha**



169 841

*“Esta tese não inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri”*



**Universidade de Évora  
Évora, 2007**

U.E Serviços Acadêmicos	N.º 6213364
2007 Filomena	Sector: P.G

### **Agradecimentos:**

Agradeço a todos os intervenientes do Departamento de Produção Animal I, do Instituto de Desenvolvimento Agrário e da Instalação Radioactiva pertencentes à Universidade de León (Espanha) que contribuíram para que fosse possível a realização do trabalho prático desta tese de Doutoramento.

Também desejo agradecer reconhecidamente a prestimosa contribuição dos Professores da Universidade de Évora, essenciais na finalização desta.

Foi esta tese de Doutoramento co-financiada pelo Programa Operacional Ciência e Inovação 2010 (Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior) e pelo Fundo Social Europeu. E ainda, financiada pelo Ministério da Ciência e Educação Espanhol pelo Projecto de Investigação “AGL02-01413.” A todas estas entidades um muito obrigada.

A minha sentida gratidão:

À Dra. Olga Martinho pelos excelentes conselhos.

Ao Professor Roberto Salema, um farol precioso em todos os momentos.

Ao Professor Henrique Guedes-Pinto, pela fundamental orientação e apoio.

Ao Professor Manuel Mota por toda a inextinguível ajuda.

Ao Professor Cancela D’Abreu pela relevante abertura e colaboração.

Ao Professor Luiz Lehmann Coutinho pela importante contribuição na realização deste trabalho.

A todos os meus Amigos e Colegas, que de algum modo contribuíram para que este estudo fosse possível.

Sinto-me muito agradecida aos meus Pais.

# **FCT** Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR Portugal



A realização desta tese de Doutoramento foi possível graças ao co-financiamento do Programa Operacional Ciência e Inovação 2010 (Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior) e do Fundo Social Europeu.



Também foi financiada pelo Ministério da Ciência e Educação Espanhol pela bolsa AGL02-01413.

<b>I. RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>I. ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>II. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
<b>A. Biologia da lactação .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Ovelha Churra .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Esquemas de selecção dos ovinos de leite.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Utilização de técnicas moleculares nos esquemas de selecção dos ovinos de leite .....</b>	<b>14</b>
<b>5. Breve descrição das fases de desenvolvimento da glândula mamária ....</b>	<b>18</b>
<b>5.1 Células-mãe .....</b>	<b>20</b>
<b>5.2. Controlo hormonal do desenvolvimento da glândula mamária e da produção de leite .....</b>	<b>23</b>
<b>5.2.1. Estrogénio .....</b>	<b>24</b>
<b>5.2.2. Progesterona .....</b>	<b>25</b>
<b>5.2.3. Lactogénio da placenta .....</b>	<b>26</b>
<b>5.2.4. Prolactina .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.5. Oxitocina .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.6. Hormona do crescimento .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2.7. Glucocorticóides .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2.8. Hormonas da tiróide .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2.9. Insulina .....</b>	<b>30</b>
<b>6. Composição do leite .....</b>	<b>31</b>
<b>7. Biosíntese dos compostos do leite .....</b>	<b>33</b>
<b>7.1. Síntese de proteínas do leite .....</b>	<b>33</b>
<b>7.2. Síntese da gordura do leite .....</b>	<b>40</b>
<b>7.3. Síntese da lactose do leite .....</b>	<b>43</b>



8. Factores que influenciam a produção láctea nos ovinos .....	44
<b>B. Conceitos básicos da expressão de genes .....</b>	<b>47</b>
<b>1. Regulação da transcrição .....</b>	<b>47</b>
1.1. Introdução .....	47
1.2. Mecanismo de transcrição e promotores centrais .....	50
1.3. Promotores de regulação .....	54
1.4. Sequências incrementadoras ou activadoras .....	55
1.5. Cromatina .....	56
1.6. Elementos silenciadores .....	57
1.7. Factores de transcrição .....	58
1.8. Epigenética .....	59
<b>2. Regulação depois da transcrição .....</b>	<b>61</b>
2.1. Regulação da estabilidade e da degradação do mRNA .....	59
2.2. Regulação do alargamento da transcrição .....	62
2.3. Maturação alternativa do mRNA ( <i>splicing</i> ) .....	64
2.4. Maturação <i>trans</i> do mRNA .....	65
2.5. Regulação do transporte de mRNA .....	65
2.6. Localização intracelular do mRNA .....	65
2.7. Regulação da poliadenilação do mRNA .....	66
2.8. Interferência de RNA (RNAi) .....	67
2.9. Edição do RNA .....	69
<b>3. Modificações das proteínas depois da tradução .....</b>	<b>69</b>
<b>C. Métodos de análise da expressão do mRNA .....</b>	<b>70</b>
1. Introdução .....	70
2. Differential display .....	70
3. Northern blot (Transferência de RNA) .....	83
4. Hibridação subtractiva ou competitiva .....	90
5. Análises em série da expressão genética (SAGE -Serial Analysis of Gene Expression) .....	92

6. Reacção de transcriptase reversa de polimerase em tempo real (RT-PCR -Real-time reverse transcription polymerase chain reaction) .....	96
7. Microarrays de DNA .....	100
8. Aplicação das técnicas de differential display e de microarrays no estudo da expressão diferencial de genes na glândula mamária de animais lactentes e não lactentes.....	104
 <b>IV. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>111</b>
 <b>A. Desenho Experimental.....</b>	<b>111</b>
 <b>B. Universidade de León .....</b>	<b>114</b>
<b>1. Recolha do material biológico .....</b>	<b>114</b>
<b>2. Obtenção do RNA .....</b>	<b>115</b>
2.1. Preparação do laboratório para o trabalho com RNA .....	115
2.2. Extracção do RNA total .....	115
2.3. Eliminação do DNA contaminante .....	116
2.4. Quantificação e estimativa da pureza do RNA .....	117
2.5. Verificação da integridade do RNA .....	117
<b>3. Differential Display .....</b>	<b>118</b>
3.1. Reacção da transcriptase reversa (RT) .....	118
3.2. PCR .....	118
3.3. Electroforese .....	119
3.4. Obtenção das bandas que se expressam de forma diferencial .....	120
3.4.1. Reamplificação do fragmento de cDNA .....	120
3.4.2. Clonagem das bandas candidatas .....	121
3.4.2.1. Ligação .....	121
3.4.2.2. Transformação .....	122
<b>4. Sequenciação .....</b>	<b>124</b>
4.1. Electroforese .....	125
<b>5. Identificação das sequências (BLAST) .....</b>	<b>125</b>

<b>6. Transferência de RNA (Northern Blot) e hibridação de sondas específicas .....</b>	<b>126</b>
<b>6.1. Extracção de RNA .....</b>	<b>126</b>
<b>6.2. Electroforese do RNA .....</b>	<b>126</b>
<b>6.3. Transferência e fixação do RNA desnaturalizado à membrana .....</b>	<b>127</b>
<b>6.4. Purificação da sonda .....</b>	<b>128</b>
<b>6.5. Hibridação de RNA .....</b>	<b>129</b>
<b>6.6. Contagem de centelheo .....</b>	<b>130</b>
<b>6.7. Lavagem e fixação da membrana .....</b>	<b>130</b>
<b>6.8. Detecção e análises do resultado da hibridação .....</b>	<b>131</b>
<b>6.9. Revelação da película de auto-radiografia .....</b>	<b>131</b>
<b>6.10. Quantificação dos resultados de hibridação Northern blot .....</b>	<b>131</b>
<b>6.11 Sonda <math>\beta</math>-actina .....</b>	<b>132</b>
<b>6.12. Recuperação da membrana (<i>Stripping</i>) .....</b>	<b>133</b>
<b>C. GenHunter .....</b>	<b>134</b>
<b>1. Obtenção do cDNA das bandas candidatas de colónias enviadas por GenHunter .....</b>	<b>134</b>
<b>2. Identificação das sequências (BLAST) .....</b>	<b>135</b>
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>137</b>
<b>1. Estimativa da concentração, grau de pureza e integridade do RNA ...</b>	<b>137</b>
<b>A. Géis de Differential Display realizados na Universidade de León. Obtenção do cDNA das bandas candidatas, clonação e sequenciação. Identificação das sequências (BLAST) .....</b>	<b>137</b>
<b>B. Géis de Differential Display realizados em GenHunter. Obtenção do cDNA das bandas candidatas, a partir de colónias de bactérias transformadas. Identificação das sequências (BLAST). Confirmação da expressão diferencial (Northern Blot) .....</b>	<b>144</b>

<b>VI. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>167</b>
<b>A. Géis de Differential Display realizados na Universidade de León. Obtenção do cDNA de bandas candidatas, clonagem e sequenciação. Identificação das sequências (BLAST) .....</b>	<b>167</b>
<b>B. Géis de Differential Display realizados em GenHunter. Obtenção do cDNA das bandas candidatas a partir de colónias de bactérias transformadas. Identificação das sequências (BLAST). Confirmação da expressão diferencial (Northern Blot) .....</b>	<b>171</b>
<b>VII. CONCLUSÕES .....</b>	<b>199</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>201</b>



## I. RESUMO

Estudou-se a expressão diferencial de genes na glândula mamária de nove ovelhas da raça Churra em diferentes estados produtivos: não-lactentes, lactentes com elevada e baixa produção de leite. Utilizando a técnica de “differential display”, por amostra de RNA total, realizou-se a reacção de transcriptase reversa (três *primers*-“âncora”) e a reacção de amplificação da polimerase (oito *primers*-“arbitrários”). Após electroforese detectaram-se 21 bandas de cDNA potencialmente interessantes. Após clonagem e sequenciação escolheram-se onze bandas para confirmar a expressão diferencial com “Northern blot”. Os resultados não permitiram distinguir expressão diferencial em quatro bandas, mas confirmaram a expressão mais intensa de seis mRNA em animais lactentes que apresentam homologia com genes que codificam proteínas do leite, reguladores do volume celular e relacionados com a actividade metabólica. O mRNA expresso intensamente em animais não-lactentes parece ser codificado por um gene da família de carreira de solutos. Identificaram-se assim genes potencialmente responsáveis pela productividade leiteira.



## **DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN THE MAMMARY GLAND OF “CHURRA” EWES IN DIFFERENT PRODUCTIVE STAGES**

### **I. ABSTRACT**

Mammary glands of nine “Churra” sheep at three productive stages (dry period, lactating with low and high milk yield) were used to study differential gene expression. According to the differential display technique, three different anchor-primers and eight arbitrary primers from each RNA sample were used in reverse transcription and amplification steps, respectively. Following electrophoresis, 21 cDNA bands of potential interest were detected. These bands were cloned and sequenced; eleven of them, considered as potentially interesting candidates, were chosen and further characterized by Northern blot. Four transcripts showed no marked differences among groups. There were six up-regulated mRNAs which exhibited significant homology with milk proteins genes and genes related to energy metabolism and cellular volume. A down-regulated mRNA was found which could be related with the solute carrier family genes, although BLAST analysis was not conclusive. Therefore, genes potentially related with milk production have been detected.





## II. INTRODUÇÃO

A raça de ovelhas Churra, criada no norte de Espanha, permite a sobrevivência económica de muitos agricultores, quer pela produção de carne (cordeiros alimentados com leite) e láctea, sendo o leite processado para dar lugar a queijos com denominação de origem “Queso Zamorano”. Desta forma, qualquer esforço realizado no sentido de compreender os mecanismos biológicos que controlam a expressão diferencial de genes na glândula mamária em diferentes etapas produtivas poderá ajudar a incrementar a produção de leite e, conseqüentemente, a melhorar as condições de vida dos produtores.

Foram realizados muitos esforços para a compreensão dos mistérios da vida que permitiram a descoberta do DNA como forma básica do material genético, a revelação da natureza química e estrutural dos genes e o estabelecimento do dogma central da genética até à sequenciação completa ou parcial do genoma de algumas espécies. No entanto, a sequenciação do genoma não nos permitiu ainda compreender como é controlado de forma precisa o fluxo de informação unidireccional desde a sequência de nucleótidos de DNA ao RNA mensageiro, até à sequência de aminoácidos da proteína (dogma central da genética). Por isso, a compreensão de como as células regulam a expressão dos genes em doenças ou em diferentes etapas fisiológicas, de desenvolvimento, ou produtivas, é de importância fundamental, continuando a ser um dos objectivos principais na pesquisa genética.

A tentativa de compreender os mecanismos que regulam a expressão dos genes em doenças ou em diferentes estados fisiológicos levou à necessidade de identificar, isolar e caracterizar os genes que se expressam de forma diferencial. Para isso desenvolveram-se técnicas capazes de identificar RNA mensageiros e proteínas importantes para a compreensão de diversos processos fisiológicos. Uma dessas técnicas, designada por differential display (DD) (Liang e Pardee, 1992), permite a identificação de RNA mensageiros em células ou em tecidos, em particular os que apresentam expressão alterada resultante de diferenças na transcrição ou na degradação do RNA mensageiro. A differential display permite a comparação da expressão de RNA mensageiro simultaneamente em muitas amostras que se encontrem em diferentes condições fisiológicas.

Neste trabalho estudou-se a expressão diferencial de RNA mensageiro na

glândula mamária de ovelhas Churra em diferentes estados produtivos: período não-lactente e lactente e ainda em ovelhas lactentes com elevada produção de leite e lactentes com baixa produção de leite, utilizando a técnica de differential display e confirmando a expressão diferencial com a técnica de Northern blot.

### III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### A. Biologia da lactação

##### 1. Introdução

Existem na natureza espécies animais pertencentes à classe *Mammalia* que se caracterizam, sobretudo, por apresentarem glândula mamária destinada a alimentar os descendentes depois do nascimento. Antes do nascimento, o desenvolvimento da maioria dos mamíferos ocorre devido à placenta. Depois do nascimento e até que possam ingerir comida sólida, as necessidades de alimentação e de nutrição são cobertas pelo leite, fluido fisiológico produzido pela glândula mamária. O leite fornece proteínas, minerais, hidratos de carbono, ácidos gordos assim como factores de crescimento moduladores do sistema imunológico, actuando muitas vezes como protector para as alergias. Foi definido como o alimento mais perfeito da natureza (Rijnkels, 2002; Roncada *et al.*, 2002; Rijnkels *et al.*, 2003).

O homem, no processo de domesticação de alguns mamíferos, conseguiu seleccionar animais capazes de produzir um volume de leite superior ao necessário para alimentar a sua descendência. Este volume é a base da indústria leiteira, tão importante nos países ocidentais (Haenlein, 2007).

Os sistemas de exploração de ovelhas apresentam uma grande diversidade, que podem ir de sistemas intensivos a extensivos, reflectindo a variedade genética das muitas raças destes pequenos ruminantes. Frequentemente na Europa, mas principalmente no Mediterrâneo estes pequenos ruminantes, nomeadamente os ovinos de leite, são constituídos por raças autóctones bem adaptadas às suas áreas produtivas, muito vezes em zonas menos favorecidas de recursos naturais e não utilizados por outras espécies. Para além de contribuir na manutenção da paisagem e do equilíbrio ecológico, os rendimentos provenientes das ovelhas criam uma actividade económica importante para as comunidades dessas zonas. Estes aspectos conferem a estes pequenos ruminantes importância social e ecológica dificilmente valorizável. Embora em alguns casos se tenha tentado utilizar raças estrangeiras ou melhoramentos genéticos das raças autóctones com cruzamentos com raças forâneas é mais frequente

os produtores apostarem pela selecção de raças puras locais melhor adaptadas as regiões onde são produzidas (Boyazoglu e Morand-Fehr, 2001; Ugarte *et al.*, 2002; Barillet, 2007).

Devido à boa adaptação das raças ovinas locais ao próprio sistema de produção, à implementação de programa de selecção de animais de forma a permitir aumentar a produção, assim como a dificuldade das raças forâneas em se adaptarem aos sistemas de produção e o facto de em muitos casos a produção das raças locais irem unidas a determinadas marcas de qualidade, faz com que ainda hoje os ovinos de leite mantenham uma grande variedade de raças produtivas (Boyazoglu e Morand-Fehr, 2001; Ugarte *et al.*, 2002).

Na Europa, especialmente nos países do Mediterrâneo, é comum a utilização de ovelhas leiteiras nos sistemas agrários. A maioria das ovelhas leiteiras dos países do Mediterrâneo é de dupla aptidão, dando origem a rendimentos pela produção de carne (cordeiros alimentados com leite) e láctea, sendo o leite processado para dar lugar a queijos de elevada qualidade, vendidos muitas vezes como produtos típicos com dominação de origem protegida (DOP) de acordo com as leis da União Europeia. Dado que o leite representa de 65 a 70% do rendimento económico obtido pelos produtores das ovelhas leiteiras, tenta-se incrementar a respectiva produção (Boyazoglu e Morand-Fehr, 2001; Barillet *et al.*, 2005; Barillet, 2007).

## **2. Ovelha Churra**

A raça de ovelhas Churra caracteriza-se por ter um temperamento vivo e resistente, capaz de procurar alimentos em condições adversas, demonstrando uma enorme capacidade de adaptação ao meio (“Castilla y León“), o que torna, segundo a Associação de Criadores, impossível encontrar outra raça pura, que em idênticas condições de tratamento seja tão rentável.

Esta raça de ovelhas foi definida pela Federação Espanhola de Associação de Gado Seleccionado como uma das mais primitivas de Espanha, admitindo que no princípio do quaternário e durante o Paleolítico e o Neolítico, existia já em Espanha uma população que se estendia desde a bacia Mediterrânea e que tinha como representante o tipo classificado como DUERST, com a denominação de *Ovis aries*

*Studery* e que ao longo do Cantábrico e do Mediterrâneo, deixa as raças Churra e Lacha como representantes. A raça Churra foi considerada dentro do tronco Churro procedente do ovino primitivo *Ovis aries Celticus*, assentando principalmente na comarca de Tierra de Campos (“Castilla y León”) (Fuentes *et al.*, 2000; Feagas, 2004).

Morfologicamente a ovelha desta raça é eumétrica e longilínea. A coloração da pelagem é branca com manchas centrífugas negras bem delimitadas à volta dos olhos, nas orelhas, nos lábios, no focinho e na parte distal das extremidades. O seu velo branco é aberto com madeixas largas e cónicas. O macho tem um peso médio de 75 kg e a fêmea de 55 kg (El-Zarei, 2005).

Estes ovinos concentram-se na bacia do rio Douro, na submeseta norte de Espanha, nas províncias de Palencia, Valladolid, Zamora e León, pertencentes à comunidade autónoma de “Castilla y León” (figura 1). No entanto, alguns exemplares localizam-se em regiões afastadas de tal forma que deram origem a quatro ecótipos distintos. O Castelhana, o mais importante e uniforme, objecto deste estudo, o Galego muito heterogéneo racialmente, o Lebrijano ou Andaluz localizado nas províncias de Sevilha e Cádiz e o Tensino localizado nos Pirinéus é considerado pelo catálogo oficial de raças, como uma raça independente (El-Zarei, 2005).

O último censo de raças publicado pelo Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação espanhol em 1986 confirmava um total de 1 777 530 de animais, dos quais 1 388 210 eram fêmeas com mais de um ano de idade. Com estes dados, os efectivos da raça Churra representavam 10% do censo do ovino espanhol e situava-a no terceiro posto, depois das raças Merina e Aragonesa. No entanto, estes números referentes à raça Churra não correspondem à realidade actual, devido à redução do número destes animais, iniciada nos anos 70 e agravada nas últimas décadas como consequência dos contínuos e intensos cruzamentos a que estão submetidas as ovelhas, principalmente com sementais da raça Assaf e outras raças estrangeiras, em busca de maiores produções de leite. A situação criada é de tal magnitude que se pensa que neste momento a raça Churra corre perigo, se não forem tomadas medidas oportunas para a sua defesa. Embora não se disponham de dados oficiais, algumas estimativas fixam o número em 800 000 cabeças (Muñoz, 2003).

O sistema de produção que se aplica aos rebanhos de ovelhas Churra é muito variado, mas são mais frequentes os sistemas extensivos com pastoreio. Quando as

condições meteorológicas o permitem, os animais pastam durante o dia regressando ao aprisco para passar a noite (El-Zarei, 2005).

A fêmea em rebanhos bem alimentados apresenta uma grande precocidade sexual, sendo frequente o primeiro parto entre os catorze e os dezasseis meses de idade (algumas inseminações adiantam-se até aos cinco meses de idade). A gestação dura entre os 150 e 160 dias. A capacidade reprodutiva depende muito de factores extrínsecos ao animal, mas, segundo os dados registados nos rebanhos controlados, calcula-se em 150 crias nascidas por 100 ovelhas parturientes (Feagas, 2004).

A Raça Churra é uma ovelha de aptidão dupla – leite e carne. As produções médias da raça são de 128 litros normalizadas a 120 dias, com proporções de gordura e de proteína de 6,76 e de 6,28%, respectivamente. O leite produzido entre os dias 30 e 120 de lactação apresenta um conteúdo médio de caseínas de 48,4 g l<sup>-1</sup> e de proteínas do soro de 12,1 g l<sup>-1</sup>. Nesta raça de ovelhas habitualmente não se quantifica a percentagem de lactose (Gonzalo *et al.*, 1994; Othmane *et al.*, 2002a,b). As ovelhas incluídas no núcleo de selecção apresentam uma média de produção de leite de 240 litros em 120 dias de lactação, com exemplares que superam os 300 litros (Terra, 2004).

Existem grandes diferenças produtivas entre rebanhos, que se devem fundamentalmente ao maneio e à alimentação proporcionada por cada produtor, mais do que a diferenças genéticas. A produção dos ovinos costuma estar perfeitamente adaptadas à oferta de nutrientes. Por esta razão, metade das ovelhas Churras, não estão submetidas a ordenho (De la Fuente *et al.*, 1996; El-Zarei, 2005).

Nesta raça é habitual que o cordeiro mame 30 dias (condição indispensável para que se considere conforme à denominação de origem “Lechazo de Castilla y León”). Estes cordeiros são em grande parte consumidos na zona de produção, principalmente em forma de assados, como prato típico da região. A ovelha é usualmente ordenhada de forma mecânica duas vezes por dia (manhã e tarde) entre os 30 e os 120 dias após o parto, ou seja, três meses por ano. A maior parte do leite ordenhado destina-se à fabricação de queijo com denominação de origem “Queso Zamorano”. Os partos distribuem-se entre Novembro e Dezembro (31%), Fevereiro e Março (27%) e em Julho (21%). A exploração prioritária da raça Churra para a produção de leite faz com que o cordeiro seja sacrificado com o peso vivo de 9 a 11 kg (Feagas, 2004).

Em 1971 fundou-se a Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Raça

Churra “ANCHE”. Esta associação gere o livro genealógico da raça e é responsável pelo esquema de selecção.

O primeiro objectivo que se propôs no programa de selecção dos ovinos desta raça foi o aumento da produção de leite, mediante um processo combinado de selecção (por ascendência, individual e descendência). Para isso, começou-se no ano de 1986 por avaliar a descendência de 50 carneiros, estando em 2005 em prova 72 rebanhos, com uma média de 450 cabeças por rebanho (El-Zarei, 2005).

A utilização da inseminação artificial como elemento de difusão genética é muito importante nos ovinos leiteiros, sendo todos os rebanhos incluídos no núcleo de selecção desta raça inseminados artificialmente. Metade das inseminações são realizadas com sémen de carneiros “melhorantes” e as restantes com machos em prova. Até 1995 o número de inseminações foi aumentando, sem no entanto se verificar um acréscimo da fertilidade. Desde essa data, realizam-se inseminações selectivas, com uma descida clara do número de insiminações, acompanhada, no entanto, por um aumento da fertilidade obtida. Actualmente a fertilidade média por inseminação artificial ronda na raça Churra os 28% (Ugarte *et al.*, 2002; El-Zarei, 2005).

O sistema de recolha de dados em Espanha é determinado pelo controlo leiteiro oficial (B.O.E. 1997) sendo adaptado pelas associações oficiais de criadores ao esquema de selecção de cada raça. Na raça Churra os controlos leiteiros mensais são alternados entre manhã e tarde. Uma vez estimados os dados brutos de produção das distintas variáveis realiza-se a correcção dos mesmos segundo um método adequado, de forma a eliminar os factores ambientais que incidem sobre a população (Fuertes *et al.*, 1998).

Classicamente, nos programas de selecção dos ovinos leiteiros o objectivo de selecção tem sido o aumento da produção de leite por ovelha e tem-se utilizado como critério de selecção uma média estandardizada de dito carácter. No entanto, os esquemas de selecção de algumas raças como é o caso do da ovelha Churra têm incluindo o conteúdo do leite (percentagem de proteína e de gordura) uma vez que o preço ao produtor é pago em função do seu conteúdo dado que a maior parte da produção de leite de ovelha destina-se para a produção de queijo e existe uma correlação negativa entre a quantidade de leite e o seu conteúdo (Ugarte *et al.*, 2002; Gutiérrez-Gil, 2005; Barillet, 2007).



A peculiar estrutura do úbere dos ovinos, que se adapta de forma deficiente à ordenha mecânica e a necessidade de ordenhar um número elevado de animais num curto período de tempo faz com que a conformação da úbere resulte importante tanto para o maneio adequado do rebanho como para facilitar as tarefas de mão-de-obra, como para evitar possíveis problemas patológicos do úbere. Todos estes aspectos têm proporcionado a aplicação de selecção, encaminhados a modificar a morfologia do úbere de forma a adapta-lo ao ordenho mecânico (El-Zarei, 2005).

Assim, os critérios de selecção dos ovinos de raça Churra a partir do ano de 2003 têm sido a quantidade de leite ordenhado entre os dias 30 e 120 da lactação, a percentagem de proteína e de gordura e a morfologia mamária e corporal (El-Zarei, 2005).



**Figura 1.** A raça de ovelhas Churra é autóctone da comunidade autónoma de “Castilla y León”.

### 3. Esquemas de selecção dos ovinos de leite

Um dos aspectos mais importantes na exploração de gado ovino leiteiro e que contribui para a selecção do mesmo é a quantidade de leite produzida, inclui-se, no entanto, por vezes também a sua composição. De uma forma geral a hereditariedade é média para os caracteres de produção e alta para os caracteres de composição. Os ovinos apresentam uma curva de lactação ascendente de duração variável de uma a quatro semanas. Depois do pico de lactação a produção reduz-se de forma regular até que nas semanas precedentes ao período de secagem a produção cai mais rapidamente. Em contrapartida, as percentagem de proteína e de gordura apresentam uma evolução inversa à quantidade de leite, sendo mais baixa quando a produção de leite é mais elevada aumentando a partir da quarta semana (Caja *et al.*, 1986; Ugarte *et al.*, 2002; Gutiérrez-Gil, 2005; Barillet, 2007).

Existe também outro tipo de caracteres (quase sempre de determinação poligênica) que estão a adquirir uma importância nos ditos programas de selecção, devido às novas exigências do mercado europeu e os desejos dos consumidores. A melhoria destes caracteres também designados por caracteres funcionais tem por objectivo permitir reduzir os custos de produção e aumentar a qualidade e a segurança dos produtos, não pelo aumento directo na produção mas pela redução nos custos de produção (Groen *et al.*, 1997; Ugarte *et al.*, 2002; Barillet *et al.*, 2005; Barillet, 2007). Uma vez que as ovelhas leiteiras são criadas em distintas condições locais de produção, a lista de caracteres candidatos pode ser grande e incluir componentes que vão desde a eficiência alimentar (peso corporal, capacidade de ingestão, reservas corporais), os caracteres reprodutivos (precocidade sexual, capacidade de parir fora da época de partos habitual, fertilidade), à capacidade maternal (capacidade de amamentar, prolificidade), às capacidade de ordenha (morfologia do úbere, velocidade de ordenha), a resistência a doenças (mastites, scrapie, parasitas internos), à adaptação ao local de criação (longevidade, velo) entre outros (De La Fuente *et al.*, 1996; Fernandez *et al.*, 1997; El-Saied *et al.*, 1999; Gootwine *et al.*, 2001; Barillet *et al.*, 2005; Berthelot *et al.*, 2006; Casu *et al.*, 2006; Davies *et al.*, 2006; Barillet, 2007). Nas raças do Mediterrâneo cabe destacar os caracteres relacionados com a morfologia do úbere e a contagem das células somáticas (Ugarte *et al.*, 2002).

#### 4. Utilização de técnicas moleculares nos esquemas de selecção dos ovinos de leite

Nas últimas décadas foi dada maior atenção aos caracteres de produção e aos caracteres funcionais, principalmente sobre o ponto de vista da genética quantitativa, mas mais recentemente outra janela foi aberta com base nas técnicas moleculares. Principalmente têm sido aplicadas duas estratégias para a identificação de genes relacionados com caracteres que influenciam o rendimento económico dos animais. Uma dessas estratégias é conhecida por *genome scan* e possibilita definir regiões dos cromossomas que são responsáveis por uma parte da variação associada a um carácter quantitativo. Estas regiões são conhecidas por QTL (*Quantitative Trait Loci*) e o seu estudo baseia-se na identificação de marcadores que se segregam em conjunto com caracteres de interesse que sejam capazes de ser quantificados. A outra estratégia visa a detecção de genes candidatos que supostamente são responsáveis por uma considerável variação genética de um dado carácter. A estratégia de identificação de genes candidatos baseia-se na procura de polimorfismos de DNA nos genes que se esperam que tenham influência no carácter de interesse, quer pelo prévio conhecimento da sua função fisiológica (noutras espécies), quer pela sua posição no genoma (dentro de um QTL), quer pelo seu nível de expressão baseando-se nas diferenças de mRNA entre tecidos, mas também em diferentes estados do mesmo tecido. Por isso a identificação de genes candidatos passa muitas vezes pela detecção de genes que se expressam preferencialmente nos órgãos que estão relacionados com os caracteres quantitativos, como é o caso da glândula mamária nos caracteres de produção de leite e pela identificação de genes que se expressam de preferência em determinados estados relacionados com o fenótipo, como é o caso do início da lactação para os caracteres relacionados com a produção de leite. Técnicas moleculares como differential display, microarrays, hibridação subtractiva ou análises em série da expressão genética são utilizadas para detectar genes candidatos. Estes desenvolvimentos permitiram novas oportunidades com a utilização de esquemas de selecção assistida por marcadores (MAS) baseada em populações em desequilíbrio de *linkage* ou de esquemas de selecção assistida por genes (GAS) baseada em mutações casuais que permitem a selecção de forma a poder obter produtos com mais qualidade e caracteres mais

seguros (Fries e Thaller, 2003; Dekkers, 2004; Barillet *et al.*, 2005; Hagen *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2006; Pariset *et al.*, 2006; Barillet, 2007; Moiola *et al.*, 2007; Ron *et al.*, 2007).

A utilização da informação recolhida pelas técnicas moleculares já foi aplicada com sucesso em alguns casos de selecção de ovinos de leite. A implementação do programa de selecção necessita de um controlo genealógico das explorações inscritas no núcleo de selecção. Este controlo genealógico realizou-se na raça Churra, no princípio utilizando a informação obtida por diferentes polimorfismos bioquímicos. Actualmente utilizam-se sequências microssatélites (Bragança *et al.*, 1999).

Com o intuito de aumentar a rentabilidade através de um incremento da produção de cordeiros, foi iniciado um esquema de selecção de animais para introduzir o alelo B do gene FecB (Booroola) nas raças Awasi e Assaf. O gene FecB é o principal gene que afecta a taxa de ovulação em ovelhas. A formação das linhas Afec-Awassi e Afec-Assaf aumentaram a prolificidade. Foram então incorporados nos programas de selecção destas raças a MAS (com marcadores microssatélites) e a taxa de ovulação induzida. Actualmente um teste comercial permite a detecção de portadores com uma fiabilidade de 100% sem necessidade de informação sobre o parentesco (Gootwine *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2006).

Em estudos realizados na raça de ovelhas Serra da Estrela com técnica de SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphisms*) permitiram encontrar polimorfismos nas regiões codificantes do gene da hormona do crescimento (GH) (com excepção do exão 4). Foram descobertos nos ovinos dois alelos do gene da GH. O alelo Gh1 apresenta uma só cópia do gene (GH1), enquanto que no alelo Gh2 o gene é duplicado (cópias GH2N e GH2Z) estando as duas cópias afastadas em 3,5 kb. Foi observado que o genótipo Gh1/Gh1 se encontra em apenas 2% das ovelhas Serra da Estrela genotipadas e que as ovelhas que herdaram o alelo Gh2 a partir do seu progenitor podem potencialmente produzir 15 a 20% mais leite do que as que recebem o alelo Gh1 enquanto que ovelhas com genótipo Gh2/Gh2 produzem mais  $4,9 \pm 0,311/150$  dias de lactação do que ovelhas com o genótipo Gh1/Gh2 o que sugere um efeito dominante positivo do alelo Gh2 na produção de leite. Esta variabilidade polimórfica pode ser aproveitada para produzir genótipos com maior valor genético para a produção de leite (Valinsky *et al.*, 1990; Marques *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2006b,c). A caracterização

do haplotipo do gene *GH2-N* permitiu detectar dez possíveis variantes proteicas que podem diferir até quatro aminoácidos entre si. O fenótipo AB, pareceu estar relacionado com uma maior quantidade de leite produzido, uma vez que ovelhas heterozigóticas com o fenótipo AB (*GH2-N*) produzem mais  $22,6 \pm 0,5$ l/150 dias de lactação do que o fenótipo AA, que representam mais 15% de produção de leite em 150 dias de lactação. Apesar da variante B ser pouco frequente nesta raça de ovelhas poderá ser utilizada para melhorar a produção de leite (Marques *et al.*, 2006a,c).

À cerca de 20 anos atrás começaram a ser publicadas pesquisas ao nível das proteínas do leite baseadas em técnicas de electroforese que se podiam aplicar em fêmeas durante a lactação, mas a descoberta de métodos moleculares assentes no DNA (técnicas baseadas em PCR) permitiu a genotipagem de animais de qualquer sexo e idade, que vieram trazer novas possibilidades na selecção destes. No caso das cabras existe o conhecimento dos principais genes que afectam o conteúdo de proteínas nomeadamente de caseínas (responsáveis pelo rendimento queijeiro) e o seu conhecimento é aplicado nos esquemas de selecção dos animais. Nas ovelhas o estudo dos polimorfismos genéticos deu resultados menos conclusivos do que em cabras e baseia-se o seu estudo na  $\alpha$ -s1-caseína e na  $\beta$ -lactoglobulina. E embora se tenham encontrado alguns polimorfismos genéticos nas proteínas do leite de ovelha ainda não se conseguiram encontrar a relação com os caracteres de produção de leite ou com as propriedades tecnológicas do leite pelo que a aplicação do estudo do seu polimorfismo nos esquemas de selecção das ovelhas leiteiras não é geralmente recomendado (Barillet *et al.*, 2005; Barillet, 2007).

O estudo da resistência ao scrapie nos ovinos constituiu outro exemplo da aplicação da informação recolhida por técnicas moleculares como os Polimorfismos de Nucleótido Simples (SNP-*Single Nucleotide Polymorphism*) na selecção de ovinos. Nas ovelhas a susceptibilidade ao scrapie é fortemente modulada pelos polimorfismos do gene que codifica a proteína prião (*PrP*). O alelo ARR está associado com a resistência e o alelo ARQ está associado com a susceptibilidade (Hunter *et al.*, 2006). Assim, nas ovelhas a resistência ao scrapie tornou-se um carácter funcional essencial para reduzir os perigos para a saúde pública através do risco teórico de aquisição de BSE através destes pequenos ruminantes. Por decisão da Comissão Europeia 2003/100/EC foram introduzidos programas de selecção para a resistência à encefalopatia espongiforme

transmissível (TSE) nas ovelhas baseados na selecção do alelo ARR do gene *PrP*. Até à data não foi detectada ao nível da população ou por ligação genética associação com a produção de leite ou com os caracteres funcionais e os genótipos *PrP* nas ovelhas com caris leiteiro (Legarra *et al.*, 2004; de Vries *et al.*, 2005; Alvarez *et al.*, 2006; Pinelli *et al.*, 2006; Salaris *et al.*, 2006; Van Kaam *et al.*, 2006; Barillet, 2007). Surge então a necessidade de otimizar a selecção dos genótipos *PrP* e a selecção da produção de leite ou dos caracteres funcionais mantendo a variabilidade genética. Antes da selecção para o gene *PrP*, a maioria das análises nas raças das ovelhas pareciam que ser bialélicas (ARR e ARQ) no entanto foram descobertas variações atípicas destes genes. Ainda está em debate se deve ser objectivo fixar o alelo ARR no gene *PrP* ao nível da população ou gerir uma situação bialélica com uma elevada frequência do alelo ARR para evitar qualquer incidente epidémico (Barillet, 2007; Marcos-Carcavilla *et al.*, 2007).

Os mapas genéticos do gado baseiam-se em marcadores genéticos moleculares que fornecem novas ferramentas para a detecção e a realização de mapas de genes com importância económica para os animais (detecção de QTL). A detecção de QTL em ovelhas relacionados com a qualidade e a segurança dos produtos leiteiros necessita da identificação de marcadores que se segregam em conjunto com caracteres que sejam capazes de ser quantificados. Na União Europeia, uma série de projectos regionais começaram no final da década de 90 com o intuito de analisar a variabilidade genética dos caracteres económicos nas ovelhas leiteiras. A maioria da investigação centrou-se em caracteres de produção devido à falta de informação fenotípica dos caracteres funcionais. Estes projectos financiados pela União Europeia investigaram os caracteres de produção e funcionais. Participaram nesse projecto de identificação de QTL (*genome scan*) três populações de ovelhas, nomeadamente da raça Churra (população 1), da raça Lacaune (população 2) e cruzamentos das raças Sarda×Lacaune (população 3). Para caracteres relacionados com a produção de leite foram detectados 7, 15 e 27 QTL nas populações 1, 2 e 3 respectivamente. Para caracteres relacionados com o úbere foram detectados 9, 7 e 9 QTL respectivamente nas populações em estudo e 1, 2 e 4 QTL foram encontrados para a contagem de células somáticas (SCC) (mastites). Nos cromossomas em que se observou QTL para estes três tipos de caracteres, em pelo menos duas das três populações estudadas verificou-se que estes QTL eram frequentemente observados na mesma posição num dado cromossoma, verificando-se

também que regiões ortólogas do genoma dos bovinos que influenciam o mesmo carácter foram frequentemente descritas em bovinos de leite. Também foram detectados QTL na raça Lacaune relacionados com a resistência a nemátodos, a cinética de emissão de leite, a resistência a larvas de *oestrus ovis*, a produção de lã (quantidade e qualidade) e ainda com o ácido linoleico conjugado (CLA) no leite. Estes resultados permitiram uma grande contribuição para o conhecimentos de QTL de vários caracteres em ovelhas leiteiras (Barillet *et al.*, 2005; Barillet, 2007).

Têm surgido resultados promissores uma vez que foram detectados QTL para vários caracteres de interesse em ovelhas e em vacas leiteiras que podem em parte ser transferidos para ovelha. No entanto, pensa-se ser ainda necessário a realização de mapas “mais finos” de QTL antes da aplicação de MAS/GAS utilizando os conhecimentos provenientes dos QTL (Dekkers, 2004; Barillet, 2007).

No entanto, a utilização de novas tecnologias moleculares apesar de oferecerem grandes expectativas é ainda muito limitada. À medida que ditas expectativas se forem confirmando e o custo económico associado às mesmas seja mais acessível, é de esperar que ditas tecnologias sejam introduzidas nos programas de selecção de ovinos (Ugarte *et al.*, 2002; Dekkers, 2004).

## **5. Breve descrição das fases de desenvolvimento da glândula mamária**

O desenvolvimento da glândula mamária na fêmea pode dividir-se em fases distintas: embrionária, pré-puberdade, puberdade, gestação, lactação e involução. Durante a gestação ocorre um grande crescimento da glândula, verificando-se uma regressão depois do pico de lactação. Este ciclo repete-se em cada gestação e em cada período de lactação (Hennighausen e Robinson, 2001).

O crescimento embrionário da glândula mamária permite que, quando do nascimento, as estruturas básicas estejam formadas. Desta forma, pode observar-se nos bovinos que o parênquima mamário consiste numa rede de condutos rudimentares, conectados com uma pequena cisterna glandular, a qual, a sua vez, se liga à cisterna do mamilo. Aos 2-3 meses de idade, no período pré-puberdade, o crescimento do parênquima mamário nas novilhas é positivamente isométrico. Nas vacas a partir dos três meses de idade e até à puberdade, a glândula mamária cresce a um ritmo de duas a

quatro vezes superior ao resto do corpo (crescimento alométrico). Posteriormente, no período anterior à puberdade nos ruminantes, os condutos desenvolvem-se de uma forma compacta, com uma estrutura altamente arborescente dentro do tecido conectivo solto (Foley *et al.*, 2001; Capuco e Ellis, 2005; Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005).

Ao chegar à puberdade e depois de ser estabelecida a actividade cíclica dos ovários, os condutos menores proliferam rapidamente quando os níveis de estrogénio são altos, sofrendo uma pequena regressão durante as restantes fases do ciclo éstrico. Pode verificar-se que durante o período de proliferação se formam mais condutos do que os que desaparecem durante o período de regressão. Assim, forma-se uma matriz de condutos muito ramificada mas pouco desenvolvida, que representa o começo da verdadeira estrutura lobular da glândula. Verifica-se também o desenvolvimento do estroma conectivo pelo crescimento do tecido adiposo e por um desenvolvimento complementar do mioepitélio e do sistema vascular e linfático. Nesta fase pode observar-se diferenças entre espécies, dependendo da resposta específica dos elementos glandulares e das hormonas dos ovários (estrogénio, progesterona) (Sacristán *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 2002).

O úbere da ovelha tem uma posição inguinal e está constituída por duas mamas, separadas pelo suco intermamário. Anatomicamente cada mama é composta por duas partes: uma capa exterior fibroelástica (aparelho suspensor mamário) e um parênquima glandular (glândula tubo-alveolar), com respectiva irrigação e enervação (Sierra, 1995).

O parênquima glandular da ovelha adulta é constituído por unidades secretoras (acinos) formadas pelos alvéolos e pelos condutos alveolares. Estas unidades agrupam-se, formando pequenos lóbulos mamários (separados entre si por tecido conjuntivo). Os seus condutos desembocam no conduto intralobular, o qual, por sua vez, continua nos condutos interlobulares (incluídos no tecido conjuntivo que separa os lóbulos mamários). Os condutos interlobulares drenam no conduto lactífero, o qual se dirige à base da mama, desembocando no seio lactífero (Sierra, 1995), ou cisterna glandular, dividido em duas partes: uma no parênquima glandular (*pars glandularis*) e outra no interior do mamilo (*pars papillaris*), separadas por uma constrição muscular ou esfíncter, que permite a saída do leite unicamente no momento do amamentar ou da ordenha. A porção papilar desemboca no exterior pelo orifício papilar (Sierra, 1995).

Nos bovinos o desenvolvimento extensivo do úbere ocorre durante a gestação.



As hormonas características deste período estimulam o crescimento exponencial da glândula mamária. O crescimento epitelial que ocorre neste período origina uma densificação da estrutura ramificada dos condutos, observando-se também uma diferenciação final das células dos condutos intralobulares (Capuco e Ellis, 2005).

A produção de leite durante a lactação está relacionada com o número e com a actividade de secreção das células epiteliais mamárias. Nos ruminantes, a magnitude do crescimento da glândula mamária durante a lactação é limitada e parece estar restringida às primeiras semanas de lactação. Nas vacas leiteiras quase todo o crescimento mamário ocorre antes do parto e o aumento da produção de leite que ocorre até ao pico da lactação deve-se a um incremento da actividade secretora das células. Depois do pico de lactação observa-se uma gradual diminuição da produção de leite, com o decorrer da lactação. Este declinar deve-se à perda de células secretoras, pela morte celular programada, assim como a uma pequena diminuição da actividade secretória de cada célula (Capuco e Ellis, 2005; Holland e Holland, 2005).

No final da lactação ocorre uma regressão rápida dos compartimentos alveolares do úbere, com perda das células epiteliais mamárias – as principais responsáveis da produção de leite. A morfologia do úbere volta a parecer-se à de uma fêmea adulta que não está em lactação (Wagner *et al.*, 2002; Holland e Holland, 2005).

### **5.1 Células-mãe**

Durante a vida produtiva dos animais com vocação leiteira, costuma ocorrer vários ciclos de gestação e de lactação. Estes ciclos estão associados à proliferação, à diferenciação e à involução da glândula mamária. A população de células-mãe é em parte a responsável por esta sequência de acontecimentos, uma vez que apresenta capacidade quase infinita para produzir células funcionais da glândula mamária. Na glândula mamária, as células-mãe e sua descendência controlam o crescimento e o desenvolvimento da glândula por meio da renovação do próprio tecido, proporcionando os componentes necessários que permitem a produção de células diferenciadas e funcionais (Smith e Chepko, 2001; Holland e Holland, 2005; Woodward *et al.*, 2005).

Por isso, algumas das estratégias que visam o aumento da produção de leite deverão basear-se no conhecimento dos mecanismos que determinam a descendência

das células-mãe da glândula mamária, uma vez que estas apresentam várias funções, como gerar o tecido da glândula mamária adulta durante o desenvolvimento, e permitir a expansão e a remodelação do tecido durante os múltiplos ciclos de gestação, de lactação e de involução. Em alguns casos podem também ser utilizadas como reserva para reparação do tecido danificado (Woodward *et al.*, 2005).

As células-mãe classificam-se, com base na sua origem, como embrionárias ou adultas. No caso das células-mãe adultas, o tecido de origem determina as suas características, uma vez que a plasticidade destas células depende daquele tecido. Assim como as células-mãe da glândula mamária de outras espécies, as células progenitoras da glândula mamária dos bovinos (BMGPC- *bovine mammary gland progenitor cell*) não parece demonstrarem plasticidade, ou seja, só podem originar células da glândula mamária (Holland e Holland, 2005; Li e Rosen, 2005; Woodward *et al.*, 2005).

A divisão assimétrica das células-mãe origina uma célula-mãe filha e uma célula progenitora, de tal forma que este processo permite a manutenção de um conjunto de células-mãe que podem ser necessárias para crescimentos futuros, enquanto ao mesmo tempo gera uma população de células diferenciadas. Por outro lado, a divisão simétrica permite aumentar o conjunto de células-mãe uma, vez que por este processo de divisão se formam duas células-mãe (Molofsky *et al.*, 2004; Holland e Holland, 2005).

A rota biológica de descendência das células-mãe da glândula mamária começa com as células-mãe adultas e termina com células funcionalmente diferenciadas e activas. Nesta rota encontram-se as células progenitoras e as células intermediárias. As células progenitoras observam-se nas diferentes etapas de diferenciação. No início, as células progenitoras não estão diferenciadas e apresentam um certo grau de plasticidade, embora se pense que unicamente podem originar células da glândula mamária. Numa etapa da diferenciação, as células progenitoras tornam-se células intermediárias e mais tarde poderão diferenciar-se em células epiteliais ou mioepiteliais (Smith e Chepko, 2001; Holland e Holland, 2005; Dontu e Wicha, 2005; Kalirai e Clarke, 2006).

As células progenitoras primárias podem gerar células progenitoras secundárias que, por sua vez, podem sofrer múltiplas divisões e originar células progenitoras intermediárias, que sofrem diferenciações até atingirem a diferenciação final em células epiteliais ou mioepiteliais. Esta diferenciação gradual das células progenitoras intermediárias permite o aparecimento de órgãos associados à maturação ou à

funcionalidade. Um deles é a mitocôndria, uma vez que quando a célula progride para a diferenciação final carece de mais energia para as funções de secreção, necessitando assim de um aumento do número de mitocôndria de forma a dar energia para produzir e para excretar leite. Outros órgãos que surgem são os ribossomas, os filamentos perinucleares, o aparelho de Golgi e os grãos de secreção, mas também se verifica um aumento do retículo endoplasmático rugoso (Holland e Holland, 2005).

Antes da puberdade nos bovinos não se observa grande crescimento nem desenvolvimento na glândula mamária, o que sugere que as células diferenciadas terminais são necessárias para a produção de leite mas não são necessárias em número suficiente durante o desenvolvimento. Assim, antes da puberdade é de esperar encontrar a glândula mamária povoada por células-mãe, células progenitoras e células intermediárias, mas não por células diferenciadas (Holland e Holland, 2005).

O mecanismo responsável pelo controlo local do crescimento e da diferenciação da glândula mamária, não foi ainda identificado. Os possíveis candidatos incluem os factores de crescimento, as interacções da célula com o estroma extracelular e com a matriz extracelular e a comunicação directa entre células. Ainda que existam na glândula mamária dois tipos diversos de células diferenciadas, como as epiteliais e as mioepiteliais, as epiteliais são funcionais na produção e na secreção de leite, enquanto as mioepiteliais assistem às epiteliais na secreção de leite. Com o cessar da lactação observa-se uma diminuição da produção de leite e uma perda das células epiteliais mamárias. A manutenção deste equilíbrio entre células epiteliais activas e as que se perdem de forma natural depende da renovação a longo prazo e da diferenciação terminal para gerar as células epiteliais para a secreção. Enquanto as células-mãe da glândula mamária apresentam capacidade de renovação a longo prazo, as células apresentam uma vida curta (Li *et al.*, 1998; Holland e Holland, 2005).

O desenvolvimento da glândula mamária depende do crescimento e da diferenciação das células-mãe. Para que ocorra uma produção de leite máxima é necessário que se complete a rota biológica de diferenciação das células-mãe e das epiteliais. A divisão assimétrica e simétrica das células-mãe origina a população de células necessárias. São precisas células em várias etapas de diferenciação para dotar a actividade secretória que ocorre na lactação. No início da lactação, as células são rapidamente processadas por meio dos processos de diferenciação, abastecendo as

células necessárias para manter o desenvolvimento da glândula mamária e a produção de leite. Com o continuar da lactação observa-se uma relação entre o declínio do número de células epiteliais mamárias consequente da apoptose e a diminuição da produção de leite (Rudland e Barraclough, 1988; Smith e Chepko, 2001; Holland e Holland, 2005; Shackleton *et al.*, 2006).

Após a diferenciação final e a secreção exaustiva de leite pelas células, estas entram em involução, que começa com a interferência das interacções celulares, permitindo a mobilidade das células e a sua reorganização (Smith e Chepko, 2001; Holland e Holland, 2005).

## **5.2. Controlo hormonal do desenvolvimento da glândula mamária e da produção de leite**

A função principal do sistema endócrino é sincronizar o desenvolvimento da glândula mamária com o estado reprodutivo do animal e com as necessidades de leite da descendência. Os níveis de um grupo pequeno de hormonas reprodutivas, incluindo o estrogénio, a progesterona, o lactogéneo da placenta, a prolactina (PRL) e a oxitocina, modificam-se de acordo com o estado reprodutivo. Estas hormonas exercem acção directa na glândula mamária. Existe outro grupo de hormonas, designadas por hormonas metabólicas, que são as principais responsáveis pela coordenação da resposta corporal às alterações metabólicas e ao stress. Entre estas enzimas encontram-se a hormona do crescimento (GH), que exerce funções no desenvolvimento dos condutos da glândula mamária, os glucocorticóides e as hormonas da tiróide, necessárias para a secreção de leite, enquanto a insulina é requerida para o desenvolvimento da glândula mamária em culturas celulares. De forma geral, alterações nos níveis sistémicos destas hormonas metabólicas não são responsáveis por alterações no desenvolvimento da glândula mamária nem pela regulação da síntese de leite. Estas hormonas podem alterar a resposta da glândula mamária às hormonas reprodutivas e indirectamente regular a síntese e a secreção de leite por meio da alteração do fluxo de nutrientes para a glândula mamária na lactação (Neville *et al.*, 2002; Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005).

Foi recentemente publicado que a glândula mamária é um órgão endócrino capaz de sintetizar e de secretar hormonas como a GH, a prolactina, o péptido relacionado

com a hormona da paratiróide (PTHrp) e a leptina. A PTHrp expressa-se nas células epiteliais mamárias durante o desenvolvimento da lactação e estudos recentes em ratas sugerem que a sua secreção pode ser importante no transporte de cálcio do sangue para o leite. Foi encontrada a presença da hormona leptina nos adipócitos da glândula mamária da ovelha, no início da lactação, e nas células epiteliais mamárias durante a gestação, pensando-se que a leptina pode ser importante na regulação da adaptação metabólica da divisão dos nutrientes durante os processos de gestação e de lactação (Neville *et al.*, 2002; Feuermann *et al.*, 2004; Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005).

### 5.2.1. Estrogénio

O estrogénio interactua com factores de crescimento no serum mas também estimula a secreção de factores das células do estroma da glândula mamária que causam o crescimento das células epiteliais mamárias. A gestação está associada com um aumento na concentração de hormonas esteróides no plasma sanguíneo, diminuindo fortemente no termo da gestação, reflectindo a origem placentário destas hormonas (Tucker, 2000; Kaskous *et al.*, 2003a,b; Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005; Connor *et al.*, 2007).

Também se observou que o estrogénio está envolvido na iniciação da lactação no período antes do parto. O estrogénio actua de duas formas distintas para iniciar a lactação: 1) em várias espécies causa a libertação da prolactina da hipófise anterior no sangue, que por sua vez origina o início da lactação; 2) aumenta o número de receptores de prolactina nas células mamárias, o que também propicia a lactação (Tucker, 2000).

A resposta biológica aos estímulos do estrogénio inicia-se com a interacção do estrogénio com os seus receptores. A principal acção genómica dos estrogénios é mediada pelas duas isoformas de receptores de estrogénio, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , que medeiam uma grande variedade de efeitos fisiológicos e patológicos. Nos seus domínios de ligação ao DNA as duas isoformas compartilham uma homologia de 96% e reconhecem os mesmos elementos de resposta ao estrogénio (ERE) no DNA. Os receptores de estrogénio ligam-se aos elementos de resposta ao estrogénio (ERE) na região promotora originando o início da montagem do complexo de transcrição. Os ER também podem ser recrutados por meio de co-activadores ou co-repressores para regiões fora dos ERE.

Foram igualmente detectados receptores de estrogénio em membranas plasmáticas que são capazes de activar outros receptores de membrana tal como o factor de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (Schams *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006).

Num estudo realizado em tecido mamário de bovinos, verificou-se uma elevada quantidade de mRNA do ER $\alpha$  durante o período de não lactação, observando-se uma diminuição deste na fase de lactação. Por seu lado a expressão de mRNA do ER $\beta$ , pareceu ser sempre inferior à da outra isoforma de ER, não se observando diferenças do nível desta durante a gestação e a lactação. Na glândula mamária de ratas a proteína ER $\beta$  é mais abundante do que a de ER $\alpha$ , mesmo no período de lactação (Saji *et al.*, 2001; Schams *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006).

### 5.2.2. Progesterona

Nos bovinos o desenvolvimento da glândula mamária durante a gestação coincide com o aumento da secreção de estrogénio e de progesterona, que induz a síntese de DNA e o alargamento dos condutos mamários. Observou-se que o estrogénio aumenta o número de receptores de progesterona localizados nos condutos mamários (Tucker, 2000; Connor *et al.*, 2007).

Em várias espécies, incluindo nos bovinos, ocorre um rápido declínio na secreção de progesterona no período imediatamente antes do parto, coincidindo com o início da secreção de grandes quantidades de leite. Várias evidências sugerem que a progesterona actua como factor fundamental na supressão do processo lactógeno, observando-se em ratas, que a retirada de progesterona origina no parto uma diferenciação terminal e uma activação da secreção da glândula mamária, existindo também a indicação de que a progesterona actua reprimindo a expressão dos genes das proteínas do leite durante a gestação (Tucker, 2000; Buser *et al.*, 2007).

Foi publicado que a progesterona bloqueia a produção de leite de diversas formas – por exemplo, suprimindo a capacidade da prolactina para aumentar o número de receptores na glândula mamária. Além disso, a progesterona bloqueia os receptores de glucocorticóides no tecido mamário, o que suprime a actividade lactogénica dos glucocorticóides. A repressão da síntese de  $\beta$ -caseína durante a gestação, parece também



ficar a dever-se a um efeito negativo que se verifica entre o receptor de progesterona e o receptor de glucocorticoides e o factor de transcrição (Stat5a) (Tucker, 2000; Buser *et al.*, 2007).

Embora a progesterona iniba o início da lactação, uma vez que esta se inicie a administração de progesterona não produz efeito na produção de leite. A principal razão por que a progesterona não tem efeito na lactação deve-se a que os seus receptores não estão presentes ou porque não se expressam na glândula mamária durante a lactação. Por outro lado, a progesterona apresenta maior afinidade com a gordura do leite do que com os seus próprios receptores intracelulares, o que minimiza ainda mais a sua acção na glândula mamária durante a lactação. Entretanto, actua também inibindo a actividade lactógena da prolactina sobre a síntese de caseína (transcrição do gene da caseína, acumulação do mRNA e tradução) e de ácidos gordos. A administração de progesterona durante o final da gestação atrasa o aparecimento de lactose, de  $\alpha$ -lactoalbumina e de caseína, assim como a secreção total da glândula mamária. Em parte, a explicação por que a lactogénese e a actividade secretora da glândula mamária se encontram inibidas antes do parto, apesar de as células mamárias estarem funcionalmente diferenciadas, poderá dever-se a que as concentrações de progesterona se mantêm altas durante a maior parte da gestação (Sacristán *et al.*, 1998; Tucker, 2000).

### 5.2.3. Lactogénio da placenta

Dependendo da espécie, o lactogénio placentário está estruturalmente relacionado com a prolactina e/ou com a hormona do crescimento. Nos roedores, o lactogénio placentário estimula o desenvolvimento da glândula mamária, principalmente por ligação aos receptores de PRL. Nos bovinos, a concentração do lactogénio placentário encontra-se em concentrações muito baixas no serum materno relativamente ao dos fetos, enquanto a administração de lactogénio placentário apresenta pouco efeito no metabolismo de vacas lactentes. Ainda não está clara a função do lactogénio da placenta na fisiologia normal da glândula mamária nas vacas leiteiras (Tucker, 2000; Neville *et al.*, 2002).

#### 5.2.4. Prolactina

Sem prolactina e (ou) possivelmente a hormona de crescimento, os esteróides, o estrogénio e a progesterona não estimulam a mamogénese. Foi descoberto que a prolactina origina o aumento do desenvolvimento alveolar no epitélio mamário durante a gestação, pelo menos em espécies de laboratório (Tucker, 2000; Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005), em que foram descobertos alguns dos mecanismos envolvidos na indução da mamogénese. A PRL liga-se a receptores específicos na superfície da membrana das células epiteliais mamárias, o que origina a rota biológica do factor de transcrição activa-se pela fosforização da tirosina (JAK/STAT). Em ratas, se os genes que controlam o receptor de prolactina ou o factor de transcrição (Stat5a) forem inactivados não se verifica o desenvolvimento da glândula mamária, devido a uma reduzida diferenciação dos condutos mamários, o que, em última instância, origina ausência de lactação (Tucker, 2000).

Em muitas espécies, incluindo bovinos, a hormona prolactina é essencial para o início da lactação depois do parto. Observou-se um pico na secreção na prolactina algumas horas antes do parto. Estudos *in vitro* demonstraram que a prolactina, associada à insulina e ao cortisol, é necessária para a indução da síntese de proteínas do leite. Num processo biológico similar ao da mamogénese, a ligação da prolactina ao seu receptor é responsável pelo início da resposta lactogénica. Depois da ligação inicia-se uma cascata de acontecimentos que eventualmente activam os genes reguladores da síntese de proteínas do leite (Tucker, 2000; Neville *et al.*, 2002; Naylor *et al.*, 2005; Buser *et al.*, 2007).

#### 5.2.5. Oxitocina

O leite sintetizado armazena-se no compartimento alveolar e na cavidade cisterna do úbere. Entre lactações cerca de 80% do leite sintetizado no úbere das vacas leiteiras armazena-se na região alveolar. A hormona hipofisária oxitocina liberta-se, produzindo o reflexo de ejeção do leite. Em resposta à oxitocina, as células mioepiteliais que envolvem os alvéolos contraem-se e o leite alveolar transfere-se para o espaço da cisterna (Neville *et al.*, 2002; Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005).



### 5.2.6. Hormona do crescimento

A função da GH durante a lactação não está totalmente definida. Em bovinos observou-se um pico da secreção desta hormona na altura do parto, o que não permite explicar o início da lactação especialmente no primeiro período da lactogénese. Pensa-se que a GH não desempenha uma acção importante no início da lactação dos bovinos (Tucker, 2000).

Foi observado em bovinos que a GH não se liga aos seus receptores na glândula mamária, apesar de que o mRNA do receptor da GH esteja presente neste tecido. Para além disso a concentração da GH no serum não se altera como resposta aos estímulos originados pela ordenha, e a diminuição da concentração da GH no serum diminui pouco com o avanço da lactação. Os mecanismos de acção da GH estão provavelmente localizados fora da glândula mamária e deverão ser muito sensíveis a pequenas alterações na secreção da GH. Pensa-se que a GH está implicada na coordenação da distribuição dos nutrientes para a glândula mamária durante a lactação, e que torna possível o acesso de mais energia proveniente das gorduras para a glândula mamária durante a lactação, especialmente no início desta. A hormona do crescimento origina um aumento da circulação sanguínea e apresenta propriedades que permitem controlar os níveis dos lípidos e da glucose sanguínea (Tucker, 2000; Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005).

Vários estudos confirmam que a hormona de crescimento (GH) induz a secreção do factor de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) a partir das células do estroma mamário, mas também a partir do fígado. Pensa-se que o IGF-1 pode mediar a acção da GH sobre o desenvolvimento da glândula mamária por meio de mecanismos endócrinos, parácrinos ou autócrinos (Tucker, 2000; Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005).

Na lactação dos ruminantes a GH pode substituir a prolactina pela estimulação do IGF-1 e conseqüentemente manter a secreção de leite. Nos ruminantes a hormona de crescimento em conjunto com a prolactina têm uma influência na produção de leite, onde a GH influencia a síntese de gorduras e a prolactina têm efeito na síntese de proteína e de lactose (Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005).

Em cabras, tratamentos com a hormona do crescimento dão origem a um

aumento da produção de leite de 5 a 30%. Pensa-se que esta hormona afecta o balanço entre as células secretórias e o número de células mortas na glândula mamária existindo sugestões de que esta regula a expressão dos factores de transcrição Stat1, 3 e 5 (Disenhaus *et al.*, 1995; Boutinaud *et al.*, 2003; Boutinaud e Jammes, 2004).

Em vacas também foi observada uma relação positiva entre a concentração plasmática da GH e a quantidade de leite produzida. A administração de GH exógena aumenta nos bovinos a produção de leite de 6 a 30% e aumenta também a persistência da lactação. Pensa-se que este efeito da administração de GH exógena está relacionada com o aumento da mobilização das reservas corporais (Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005).

Têm-se verificado tentativas de associar a síntese de leite com os polimorfismos genéticos ao nível da hormona do crescimento na raça de cabras Algarvia. Nesse estudo em que se aplicou a técnica de SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphisms*) observou-se a existência de padrões de conformação distinta: dois nos exões 1 e 2, quatro no exão 3, seis no exão 4 e cinco no 5. Foi estabelecida uma associação entre os padrões de SSCP dos exões 4 e 5 e a quantidade de leite produzida, mas não com a qualidade do leite (Malveiro *et al.*, 2001). Um estudo realizado na raça de cabras Serrana também refere que se poderá utilizar o gene da hormona do crescimento como candidato para a selecção assistida por marcadores e sugere uma investigação mais pormenorizada do exão 4 uma vez que algumas mutações deste parecem influenciar variações na produção de leite (Marques *et al.*, 2003).

Como antes se referiu, vários estudos realizados com a técnica de SSCP permitiram observar polimorfismos no gene da GH na raça de ovelhas Serra da Estrela sendo possível associar alguns polimorfismos com uma maior produção de leite (Marques *et al.*, 2001; 2006a,b,c).

### **5.2.7. Glucocorticóides**

Nos bovinos, o cortisol é predominante glucocorticóide endógeno. A principal função do cortisol na glândula mamária é influir a diferenciação do sistema lóbulo-alveolar. Na verdade, os alvos do cortisol são o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi. Esta diferenciação induzida pelos glucocorticóides é essencial para permitir que a

prolactina induza no devido momento a síntese de proteínas do leite (Tucker, 2000; Neville *et al.*, 2002).

De maneira geral, a concentração de glucocorticóides no sangue permanece baixa durante a maior parte da gestação até precisamente antes do parto, altura em que ocorre um pico que coincide com o parto. No entanto, pensa-se que esta hormona não interfere no início da lactação e que pode estar associada ao stress do parto. Os glucocorticóides no sangue ligam-se à globulina de ligação aos corticóides (CBG), proteína que inactiva os glucocorticóides. Durante o período antes do parto, a CBG diminui, aumentando os glucocorticóides livres, o que poderá explicar a actividade lactogénica destes. Foi observado que os glucocorticóides se ligam a receptores específicos no tecido mamário e que de forma não coordenada regulam a secreção de  $\alpha$ -lactalbumina e de  $\beta$ -caseína. Recentes evidências sugerem que a secreção elevada de glucocorticóides no período antes do parto está associada à supressão do sistema imunitário, o que poderá contribuir para o aumento de incidência de mastites e de outras doenças no início da lactação (Tucker, 2000).

Em cabras e em vacas, a ligação de glucocorticóides a receptores da glândula mamária aumenta com o início da lactação e está claramente correlacionada com o consumo de glucose no tecido mamário (Tucker, 2000; Neville *et al.*, 2002).

#### **5.2.8. Hormonas da tiróide**

Durante a lactação, a glândula mamária está no estado de eutiroidismo e o resto do corpo em hipotiroidismo. Estas situações aumentam a prioridade metabólica da glândula mamária. Grandes quantidades de iodo, um componente principal das hormonas da tiróide, perdem-se no leite, o que provavelmente contribui para situações de hipotiroidismo do animal lactente (Tucker, 2000).

#### **5.2.9. Insulina**

A insulina parece estar implicada na divisão dos nutrientes na glândula mamária durante a lactação. No úbere das vacas leiteiras a utilização da glucose, do acetato, do  $\beta$ -hidroxibutirato, dos triglicéridos e dos aminoácidos é independente da insulina. No

entanto, nos tecidos adiposos a insulina aumenta a utilização do acetato para a síntese de lípidos, enquanto diminui a lipólise. Como resultado, nas vacas leiteiras a insulina está implicada nos mecanismos de divisão dos nutrientes, desviando-os da síntese de leite, em benefício dos tecidos corporais. A concentração de insulina no sangue está correlacionada negativamente com a produção de leite (Tucker, 2000; Neville *et al.*, 2002).

## 6. Composição do leite

O leite, produto de secreção da glândula mamária, apresenta uma composição que determina a sua qualidade nutritiva e muitas das suas propriedades. É constituído por uma fase aquosa (soro) e por uma sólida que, por sua vez, é composta por gorduras (triglicéridos, fosfolípidos, colesterol e ácidos gordos livres), proteínas (caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  -, lactoalbumina, lactoglobulina  $\alpha$ -,  $\beta$ -, albumina sérica, transferina, lisozima, lactoferrina e imunoglobulinas), açúcares (lactose), vitaminas e minerais. A composição do leite varia dependendo da espécie. Inclusivamente, dentro de cada espécie a composição do leite segregado não é sempre a mesma, mas varia com a raça, a idade, o estado de lactogénese e o estado de nutrição do animal, entre outros factores (Sacristán *et al.*, 1998). Entre as diferentes espécies de mamíferos, a grande variação na composição do leite deve-se, sobretudo, a grandes variações na percentagem de gordura, embora também se encontrem diferenças na distribuição quantitativa e qualitativa das proteínas. Com respeito às proteínas, foram observadas grandes variações entre espécies, encontrando-se entre 4 e 200 g l<sup>-1</sup>. Ainda que nos ruminantes as caseínas ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) constituam 80% das proteínas do leite, esta proporção pode variar entre espécies (Nishimura e Kohmoto, 2001, Hall *et al.*, 2001; Milenkovic *et al.*, 2002; Kappeler *et al.*, 2003; Hinrichs, 2004; Ramunno *et al.*, 2004).

A composição geral do leite de ovelha pode resumir-se da seguinte forma: água (82%) e matéria seca (18%). Dentro desta última fracção encontram-se as gorduras (40%), as proteínas (29%), a lactose (26%) e as cinzas (5%) (Casanova *et al.*, 1996).

Como antes se referiu, a ovelha de raça Churra da região de Castela e Leão produz uma média de 128 l de leite por lactação normalizada a 120 dias, com proporções de 6,76% de gordura e de 6,28% de proteína. O leite produzido entre os 30 e

120 dias de lactação apresenta um conteúdo médio de caseínas de  $48,4 \text{ g l}^{-1}$  e de proteínas do soro de  $12,1 \text{ g l}^{-1}$ . Habitualmente não se quantifica a percentagem de lactose nesta raça de ovelhas (Gonzalo *et al.*, 1994; Othmane *et al.*, 2002a).

Os valores de produção são comparáveis a outras raças autóctones de ovelhas leiteiras espanholas, embora o conteúdo de gordura no leite das ovelhas de raça Churra parecer ser mais baixo. Alguns autores assinalaram que o conteúdo baixo em gordura poderá estar relacionado com a alimentação (Othmane *et al.*, 2002a).

O facto de grande parte do leite de ovelha se utilizar para fabricar queijo confere especial importância aos componentes que apresentam relação directa com o rendimento queijeiro, como a gordura e a proteína. A gordura é um componente que se destaca no leite de ovelha, uma vez que confere ao leite características físicas e organolépticas muito importantes sob um ponto de vista qualitativo (Casanova *et al.*, 1996). Estudos realizados na raça Churra parecem concluir que as condições de tratamento e de alimentação dos animais exercem sobre o conteúdo de gordura do leite maior influência que outras questões relacionadas com a herança genética (Othmane *et al.*, 2002b).

O conteúdo em proteína é um factor de grande importância para a fabricação de queijo, já que é determinante no rendimento e na qualidade do produto final. No entanto, nem todas as fracções proteicas do leite contribuem de igual forma para a transformação em queijo. Assim, o conteúdo em caseínas faz parte da coalhada, enquanto as demais proteínas fazem parte da fracção do soro. Desta forma resulta evidente a importância das caseínas na fracção proteica, devido à sua influência sobre o rendimento queijeiro. Não obstante, na caseína é de grande importância a proporção das suas diferentes fracções  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ , uma vez que diversos estudos evidenciaram que algumas delas, em particular a  $\beta$  e a  $\kappa$ , podem diminuir o rendimento queijeiro (Casanova *et al.*, 1996; Othmane *et al.*, 2002b). Convém ainda assinalar que estudos realizados com ovelhas de raça Churra enfatizaram que o conteúdo em proteínas do leite apresenta elevada hereditariedade, pelo que se recomenda a selecção de animais com base neste factor (Othmane *et al.*, 2002b).

## 7. Biosíntese dos compostos do leite

Como antes se referiu, por várias razões, até à data nos programas de selecção de pequenos ruminantes se tenha centrado principalmente na quantidade de leite produzida e dado pouca importância aos constituintes do leite, no entanto, espera-se que esta tendência seja invertida uma vez que a maioria do leite destes animais é convertida em produtos lácteos e o conteúdo de proteínas e de gordura é pelo menos tão importante como a quantidade de leite produzida (Barillet, 2007; Moiola *et al.*, 2007).

### 7.1. Síntese de proteínas do leite

As proteínas são importantes para a qualidade e para a composição do leite. Nos bovinos, as caseínas e as lactoglobulinas  $\alpha$ ,  $\beta$ - (WAP- *whey acidic proteins*) constituem 95% das proteínas do leite. O conteúdo médio de proteínas no leite das ovelhas é de 5,8% (peso/peso) e é maior do que o de cabra 4,6% (peso/peso) ou do que o de vaca 3,3% (peso/peso). Nas ovelhas, as quatro caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ - representam cerca de 76 a 83% do total de proteínas do leite, enquanto que as WAP constituem de 17 a 22%. Sob o ponto de vista da produção, a proporção das caseínas determina o rendimento queijeiro (Braunschweig *et al.*, 2000; Akers, 2002; Chessa *et al.*, 2003; Holland *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2007).

A comparação da expressão de genes na glândula mamária de bovinos permitiu demonstrar que as proteínas do leite representam a maior parte das proteínas que se expressam na glândula mamária em lactação. As caseínas ( $\alpha$ -s1- e  $\beta$ ) encontram-se entre as que apresentam uma maior expressão em animais lactentes comparativamente com não lactentes (Suchyta *et al.* 2003). No entanto, segundo o estudo de Park *et al.* (2007) o leite de ovelha apresenta em média maior concentração das caseínas ( $\alpha$ -s2- e  $\beta$ ) mas também da caseína ( $\alpha$ -s1), sendo a  $\kappa$ -caseína a que apresenta menor concentração comparativamente com as outras.

Observou-se que as variantes genéticas das principais proteínas do leite de ovelha influenciam a composição e as condições tecnológicas do leite. Existem cinco variantes polimórficas da  $\alpha$ -s1-caseína, designadas de A a E, que se devem principalmente a substituições de um ou vários aminoácidos, que afectam o grau de

fosforilação das proteínas. Na raça de ovelhas Sarda, o genótipo CC está associado a um maior conteúdo de caseínas comparativamente com o genótipo CD ou DD (“Welsh”) sendo este último relacionado com o menor conteúdo de caseínas e com um decréscimo na capacidade de coalhar o leite para fazer queijo. No entanto, este alelo é muito raro em várias raças estudadas. A  $\alpha$ -s2-caseína parece ser a fracção mais heterogénea devido ao seu nível de fosforilação. Observam-se formas distintas desta caseína resultantes da maturação alternativa ao nível do mRNA. As três variantes da  $\beta$ -caseína não se devem a polimorfismos genéticos, mas sim a variações no grau de fosforilação na cadeia de proteínas. Enquanto que na  $\kappa$ -caseína das ovelhas não foram caracterizadas até à data variações genéticas e o seu polimorfismo fica a dever-se a diferentes graus de glicosilação e de fosforilação (Pirisi *et al.*, 1999; Amigo *et al.*, 2000; Moioli *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007; Barillet, 2007).

Em ovinos foram detectadas três variantes genéticas (A, B e C) da  $\beta$ -lactoglobulina. As variantes A (tirosina) e B (histidina) apresentam diferentes aminoácidos na posição 20. Em várias raças de ovinos estudados só foi detectada e com baixa frequência a variante C na raça Merina. A variante C também é resultante da alteração de um só aminoácido. Ao contrário do que se verifica com os caprinos não se observou nas várias raças de ovinos estudadas resultados consistentes que permitissem relacionar os polimorfismos A e B da  $\beta$ -lactoglobulina com o rendimento na fabricação de queijos ou com caracteres de produção. Na raça Churra o genótipo AA parece estar relacionado com uma maior produção de queijo do que os genótipos AB ou BB (Barillet *et al.*, 2005; Barillet, 2007; Moioli *et al.*, 2007).

Foram detectadas duas variantes da proteína  $\alpha$ -lactoglobulina (A e B). Foi analisada a sequência de nucleótidos do mRNA da  $\alpha$ -lactoglobulina de ovelha e foram determinados três variantes nos nucleótidos dos codões. Ainda não foram realizados estudos sobre a influência destas variantes no rendimento da fabricação de queijos (Moioli *et al.*, 2007).

Os quatro genes que codificam as caseínas estão fisicamente ligados na seguinte ordem:  $\alpha$ <sub>s1</sub>,  $\beta$ ,  $\alpha$ <sub>s2</sub> e  $\kappa$ . A estrutura e a orientação do *locus* das caseínas estão bastante conservadas em todas as espécies estudadas até à data. Dependendo da espécie, o *cluster* total dos genes das caseínas está compreendido numa região de 250 a 350 kb. A

região em que se pode observar este *cluster* é rica em AT (< 37% GC) e apresenta um conteúdo de repetições abaixo da média. Por outro lado, foram descritas algumas diferenças nas distâncias que separam os genes das caseínas e no número de genes em algumas espécies (um gene extra de caseína  $\alpha_{s2}$  foi detectado em ratos, em ratazanas, em coelhos e em humanos). A análise comparativa do *cluster* dos genes das caseínas demonstra elevada divergência na região de codificação, que parece ter origem no uso variável dos exões e de divergências na evolução (Rijnkels, 2002).

Três ( $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_{s2}$ ) das quatro caseínas são sensíveis à precipitação com cálcio e apresentam peso molecular similar (aproximadamente 24 kDa), regiões promotoras idênticas e localização similar dos sítios de fosforização. Estes dados apoiam a hipótese de uma origem comum destes genes, por duplicação de um gene ancestral. Também a presença dos genes das caseínas sensíveis ao cálcio e de a  $\kappa$ -caseína em todas as espécies de mamíferos existentes parece indicar uma origem comum dos genes antes da evolução separada das espécies, embora se pense que o gene da  $\kappa$ -caseína não está relacionado evolutivamente com os outros genes das caseínas. Contudo, o padrão de expressão é similar e o produto proteico é essencial para a formação e para a estabilidade das micelas (Rosen *et al.*, 1999; Braunschweig *et al.*, 2000; Rijnkels, 2002; Milenkovic *et al.*, 2002; Ramunno *et al.*, 2004).

No homem (*Homo sapiens*) podem encontrar-se os quatro genes de codificação das caseínas do leite no cromossoma 4 (4q21), na ratazana (*Ratus norvegicus*) no cromossoma 14 e na rata (*Mus musculus*) no cromossoma 5 (44,91 cM). Nos bovinos, (*Bos taurus*) os quatro genes das caseínas encontram-se em 250 kb do cromossoma 6 (6q31-33). Também em ovelhas (*Ovis aries*) e em cabras (*Caprus hircus*) estes genes se encontram no cromossoma 6. No porco (*Sus scrofa*) pode-se observar no cromossoma 8 (Barillet *et al.*, 2005; Huq *et al.*, 2005).

Os genes que codificam as proteínas do leite são regulados por uma interacção complexa de hormonas esteróides e peptídicas, predominantemente as lactogénicas como a prolactina, a insulina e a hidrocortisona, assim como por interacções entre células. Estes genes específicos do tecido mamário exibem padrões de expressão determinados pela fase de desenvolvimento da glândula mamária (Rosen *et al.*, 1999; Rosen, 2003; Bevilacqua *et al.*, 2006).

A expressão dos genes das proteínas do leite é controlada ao nível da transcrição



por regiões com promotores que contêm CoRE (*composite response element*). Os CoRE são um *cluster* de sítios de ligação a factores de transcrição que contêm elementos de regulação positivos e negativos capazes de integrar a rota biológica dos sinais de tradução por meio de interacções de proteína – DNA e proteínas –, de forma a conferir padrões de expressão ajustados. Na maioria dos casos, o nível de activação da transcrição obtida nos CoRE é muito mais elevado do que a acção combinada de cada factor de transcrição individualmente, sendo frequente que os CoRE recrutem os factores de transcrição de diferentes famílias para a mesma região promotora. Os CoRE dos promotores de genes das proteínas do leite exemplificam estes princípios. Nenhum dos factores de transcrição que se liga aos sítios de ligação dos CoRE e que são necessários para a síntese de proteínas do leite são específicos do tecido mamário ou estão restringidos à glândula no período de lactação. Mas a combinação única dos factores de transcrição é específica da síntese de proteínas do leite na glândula mamária em lactação. Para as proteínas WAP (lactoglobulinas  $\alpha$  e  $\beta$ ) são essenciais os factores nucleares (NF)-I, os receptores glucocorticóides (GR) e o factor de transcrição Stat5. Para a  $\beta$ -caseína participam na activação da transcrição o Stat5, o GR e o C/EBP $\beta$ , enquanto o Yin Yang (YY)-1 está implicado na repressão (Rosen *et al.*, 1999; Pauku e Silvennoinen, 2004; Lenasi *et al.*, 2005).

O Stat5 é um factor de transcrição responsável pela sinalização da prolactina na glândula mamária, expressando-se em todos os estados de desenvolvimento desta. Tal factor de transcrição activa-se pela fosforização da tirosina (JAK/STAT) depois do estímulo da PRL, que se liga à parte extracelular do receptor de prolactina (PRL-R), originando uma sequência de tradução do sinal JAK/STAT. O JAK2, que está associado ao PRL-R na ausência de prolactina, activa-se por transfosforilação quando duas moléculas de JAK2 se juntam, induzidas pela ligação ao receptor. O JAK2 activado cria sítios de ligação para proteínas como o Stat5, sendo este subsequentemente fosforilado, dimerizado e transposto para o núcleo. O Stat5 assim activado liga-se à sequência de activação do GAS (*interferon-gamma-activated sequence*), o que modula a actividade dos genes-alvo, tais como os genes das proteínas do leite. A cinética de fosforilação da tirosina do Stat5 é paralela ao perfil de expressão das proteínas do leite na glândula mamária. Foi observada a existência de dois genes que codificam para o Stat5, designados por Stat5a e Stat5b. Estes são capazes de codificar isoformas distintas que

podem surgir da maturação alternativa do mRNA. A ausência de Stat5a ou de Stat5b não altera de forma drástica a expressão da  $\beta$ -caseína na glândula mamária. Todos os genes que sintetizam proteínas do leite apresentam pelo menos um sítio de ligação aos Stat5. A expressão das WAP é reduzida na ausência de Stat5a ou de Stat5b. Também foi observado que o Stat3 é fosforilado durante o período de involução da glândula mamária depois da lactação, o que leva a supor que este factor de transcrição interfere no processo. (Rosen *et al.*, 1999; Molenaar *et al.*, 2000; Groner, 2002; Paukku e Silvennoinen, 2004; Clarkson *et al.*, 2006).

O C/EBP $\beta$  e o C/EBP $\delta$  pertencem à mesma família de factores de transcrição (CCAAT/enhancer binding proteins), que parece serem importantes para o desenvolvimento da glândula mamária e para a expressão das proteínas do leite. O promotor próximo da  $\beta$ -caseína contém quatro sítios de ligação para os C/EBP, dos quais três se encontram na região promotora mínima, essencial para a resposta hormonal. Análises de mutações revelam que estes sítios de ligação para os C/EBP são importantes para a activação da transcrição do promotor da  $\beta$ -caseína. Foi observado que o mRNA do C/EBP $\beta$  codifica três isoformas proteicas diferentes, duas das quais designadas por LAP (*liver-enriched activating proteins*) e a outra por LIP (*liver-enriched inhibitory proteins*). Esta última actua como factor de transcrição negativo. Durante a gestação existe um elevado nível da razão LIP/LAP. No início da lactação os níveis de LIP diminuem drasticamente, enquanto os de LAP diminuem em menor quantidade. Pensa-se que durante a gestação a actividade de LAP, assim como de outros C/EBP, é inibida pelo LIP. É provável que este seja um mecanismo de inibição da expressão dos genes de caseína no início da gestação. A diminuição do LIP quando se inicia a lactação resulta provavelmente numa libertação da inibição da transcrição, que permite que o LAP active os promotores dos genes das proteínas do leite. A ausência de C/EBP $\beta$  reduz a expressão dos genes da  $\beta$ -caseína entre 85% e 100%, não se detectando a presença das WAP. O promotor da  $\beta$ -caseína apresenta sítios de ligação para o C/EBP $\beta$ , pelo que estes resultados são consistentes, mas o efeito sobre a expressão do WAP deverá ser indirecto, uma vez que os promotores das WAP não parece apresentarem sítios de ligação ao C/EBP (Rosen *et al.*, 1999; Grimm e Rosen, 2003).

Existem diferentes isoformas dos factores nucleares (NF)-I, específicas para diversos tecidos. As isoformas (NF)-I, específicas da glândula mamária, são

componentes importantes dos CoRE que regulam a expressão dos genes codificadores das proteínas WAP (Rosen *et al.*, 1999; Rosen, 2003).

Embora os glucocorticóides (GR) sejam importantes na expressão dos genes das proteínas do leite, a maioria destes não apresentam os elementos consensuais de resposta aos glucocorticóides (GRE). O promotor do WAP contém um *cluster* com metade do GRE nas regiões de regulação próxima e distal. A região próxima da  $\beta$ -caseína também apresenta várias metades de GRE. Ainda que os glucocorticóides sejam hormonas lactogénicas essenciais, os mecanismos pelos quais regulam a expressão das proteínas do leite de forma sinérgica com a PRL e a insulina não estão totalmente definidos. O Stat5 e os GR activam a transcrição do promotor da  $\beta$ -caseína. Pensa-se que a interacção entre proteínas Stat5 e os GR protege o Stat5 de desfosforilação. Esta situação permite ao Stat5 permanecer ligado ao DNA por um período de tempo maior, o que aumenta a actividade de transcrição do Stat5, mas parece que a sinergia de transcrição que existe entre o Stat5 e os GR no promotor da  $\beta$ -caseína é conferida por múltiplos mecanismos (Rosen *et al.*, 1999; Reichardt *et al.*, 2001; Groner, 2002; Buser *et al.*, 2007).

O promotor da  $\beta$ -caseína contém uma região de regulação negativa. Estes elementos bipartidos presentes na região promotora de caixa do leite, designados por YY1, reprimem a transcrição, na ausência de hormonas lactógenas. O efeito do YY1 é compensado pelo Stat5. Foi aventado que interacções entre C/EBP $\beta$  e YY1 são capazes de se ligar à região promotora de caixa do leite, originando a repressão do gene da  $\beta$ -caseína (Rosen *et al.*, 1999).

Como referido, a activação da transcrição de um CoRE é geralmente maior do que a soma das suas partes. Os factores de transcrição actuam de forma cooperante e as interacções proteína/proteína entre estes são provavelmente tão importantes como a interacção de cada factor de transcrição com o elemento de resposta. O Stat5 e o GR exibem uma elevada sinergia na transcrição do promotor da  $\beta$ -caseína. Também os factores de transcrição de forma cooperante podem actuar nos CoRE para recrutar co-activadores e co-repressores (Rosen *et al.*, 1999).

Tal como a acetilase das histonas está implicada na remodelação local da cromatina nos genes activos, as histonas deacetilases (HDAC) modulam a estrutura local da cromatina de forma a reprimir a transcrição. Foi sugerido que o YY1 reprime o

promotor da  $\beta$ -caseína, por fazer aproximar ao promotor as enzimas HDAC, capazes de criar uma configuração da cromatina de repressão. Dado que o YY1 é susceptível de interagir com o C/EBP $\beta$  e que o sítio de ligação do YY1 no promotor da  $\beta$ -caseína é de fraca ligação, um complexo de LIP/YY1 pode ser responsável pela manutenção da ligação forte do YY1 e do HDAC ao promotor. Quando os níveis de LIP diminuem no final da gestação, o complexo pode então dissociar-se (Rosen *et al.*, 1999).

Estudos demonstraram que a insulina e os factores de crescimento, como o factor de crescimento semelhante à insulina (IGF)-I e II, têm efeito no nível de transcrição da  $\beta$ -caseína. No entanto, a insulina apresenta uma capacidade de estimular a expressão de genes das proteínas dez vezes superior à dos IGF-I e IGF-II. Pensa-se que a estimulação de transcrição dos genes das proteínas do leite dependentes da insulina pode implicar a modulação de sinalização à PRL e à rota biológica JAK/STAT. Também se pensa que a insulina pode estimular a síntese de proteínas do leite por meio da modulação da absorção e/ou do metabolismo dos nutrientes (Rosen *et al.*, 1999).

Sabe-se que a matriz extracelular (ECM) exerce funções essenciais em todas as etapas de desenvolvimento da glândula mamária. Uma das funções da ECM durante a lactação é a regulação da expressão dos genes das proteínas do leite. Foi observado uma região a montante do gene da  $\beta$ -caseína, designada por BCE ( $\beta$ -casein element 1). O BCE parece ser uma região incrementadora dependente da ECM e específica da glândula mamária. Foi observado que o BCE contém sítios de ligação para os factores de transcrição C/EBP e Stat5. Um dos mecanismos pelo qual a ECM regula a síntese de proteínas do leite parece ser por meio da modulação da rota biológica do JAK/STAT. (Rosen *et al.*, 1996; Rosen *et al.*, 1999; Talhouk *et al.*, 2001; Zoubiane *et al.*, 2004).

Estudos recentes parecem indicar que a síntese das caseínas também é controlada ao nível da tradução, uma vez que o mRNA das quatro caseínas não é traduzido com a mesma eficiência. Em ovelhas, cabras e vacas o mRNA das caseínas ( $\alpha$ -s1- e  $\beta$ ) é traduzido com aproximadamente três a quatro vezes mais eficiência do que as caseínas ( $\alpha$ -s2- e k), podendo ser esta uma das causas das diferentes concentrações das caseínas no leite dos ruminantes (Bevilacqua *et al.*, 2006).

## 7.2. Síntese da gordura do leite

O componente do leite que fornece mais energia é a gordura. Este componente também é responsável pela qualidade organoléptica e nutricional (potenciais efeitos específicos de alguns ácidos gordos sobre a saúde humana) para além de propriedades físicas do leite e dos seus derivados (Bauman e Griinari, 2003; Harvatine e Bauman, 2006; Bauman *et al.*, 2006). O conteúdo de gordura no leite apresenta diferenças marcadas entre espécies, variando desde menos de 1 até 50 por cento. Até dentro de uma espécie, o conteúdo de gordura é a variável principal dos constituintes do leite. A gordura é o componente do leite dos ruminantes que mais pode variar e no caso dos bovinos, pode alterar-se o conteúdo de gordura até três por cento. Desta forma, a maioria dos estudos de alteração da quantidade de gordura sintetizada no leite, assim como a manipulação da sua composição (ácidos gordos), baseia-se em estudos de nutrição animal (Akers, 2002; Peterson *et al.*, 2003; Jenkins e McGuire, 2006; Lock *et al.*, 2006; Bauman *et al.*, 2006).

Nos animais ruminantes estima-se a existência de mais de 400 ácidos gordos diferentes que constituem os triglicéridos da gordura do leite. Nos ovinos os triglicéridos representam aproximadamente 98% do conteúdo dos lípidos e a maioria dos triglicéridos consistem em ácidos gordos com cadeias de comprimento entre C4 e C18. Os restantes 3% dos lípidos do leite consistem noutras classes como os fosfolípidos, o colesterol, o diacilglicerol, o monoacilglicerol e os ácidos gordos livres (Bauman e Griinari, 2003; Park *et al.*, 2007).

Nos ruminantes, os ácidos gordos C4 a C14 e uma proporção dos C16 são derivados da síntese “de novo” que ocorre na glândula mamária, sendo as fontes de carbono o acetato e em menor extensão o  $\beta$ -hidroxibutirato. Os restantes ácidos gordos C16 assim como os ácidos gordos de cadeia longa são originários dos ácidos gordos da circulação sanguínea que por sua vez resultam da absorção dos lípidos da dieta ou da mobilização das gorduras corporais (Akers, 2002; Bauman e Griinari, 2006).

Há mais de um século que se sabe que a dieta pode originar o que vulgarmente se conhece por depressão da gordura do leite (MFD- *milk fat depression*). As alterações causadas durante a MFD envolvem tanto a quantidade de gordura do leite como a sua composição em ácidos gordos. Quando este fenómeno ocorre, a quantidade de gordura

do leite pode ser reduzida em mais de 50% com pouca ou nenhuma alteração na produção de lactose ou proteína. A redução representa um declínio na quantidade da maioria dos ácidos gordos, mas a composição dos ácidos gordos é alterada principalmente devido à síntese “de novo”. Observa-se também um aumento substancial dos ácidos gordos trans-C18:1. Como resultado, a composição da gordura do leite altera-se devido a uma redução dos ácidos gordos de cadeia pequena ou média e a um aumento na concentração dos ácidos gordos de cadeia larga (Bauman e Griinari, 2003; Bauman *et al.*, 2006).

No caso dos ruminantes a síntese de gordura do leite pode ser inibida por ácidos gordos que se produzem durante o processo de biohidrogenação que ocorre no rúmen. Esses intermediários da inibição são os ácidos linoléicos conjugados trans-10, cis-12 (CLA), e talvez um outro ácido gordo capazes de originar uma diminuição coordenada na expressão da glândula mamária das enzimas lipogénicas como é o caso da enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) que intervém na síntese de triglicéridos do leite (Ericsson *et al.*, 1997; Morand *et al.*, 1998; Baumgard *et al.*, 2002; Bauman e Griinari, 2003; Harvatine e Bauman, 2006; Bauman *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2007). Estudos recentemente realizados na glândula mamária de vacas parecem relacionar a MFD com a diminuição do factor de transcrição da proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol (SREBP) com o decréscimo da síntese de gordura do leite. Também parece haver evidências para a participação do S14 (*thyroid hormone responsive spot 14*) na regulação da síntese da gordura do leite que ocorre na glândula mamária (Harvatine e Bauman, 2006; Anderson *et al.*, 2007).

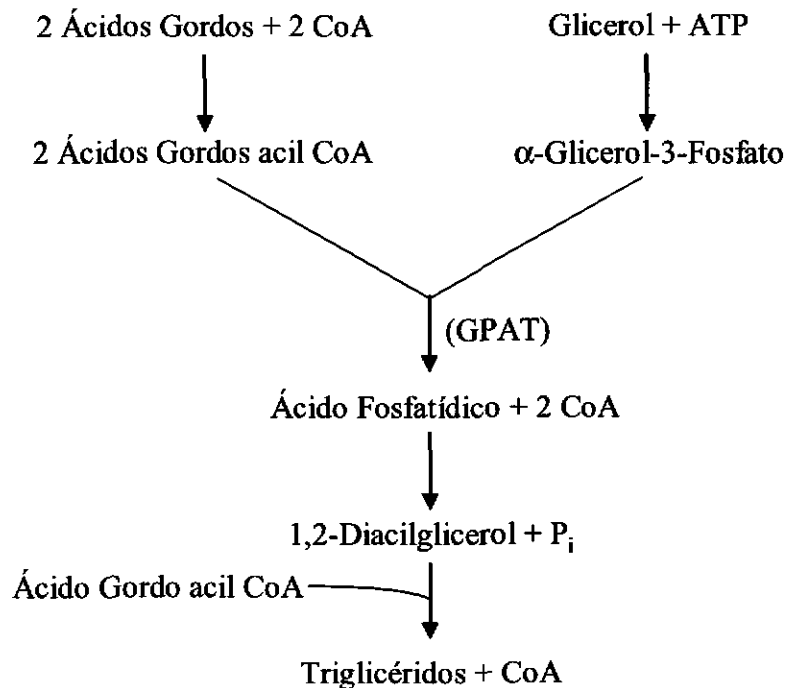
O SREBP1 é um membro da família dos factores de transcrição basais capazes de activar a transcrição dos genes para a síntese de ácidos gordos, enquanto o factor de transcrição basal SREBP2, activa a síntese de colesterol. Uma proteína de activação designada por SCAP (SREBP- *cleavage activating protein*), liga-se aos SREBPs no retículo endoplasmático e transporta-os para o aparelho de Golgi onde estes se activam como factores de transcrição (Rudolph *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2007). Os promotores destes genes contêm elementos de resposta ao esterol e sítios de ligação para o factor nuclear (NF)-Y, o factor específico (SP)1 e o (SP)3. No entanto, ainda não é conhecida a função exacta destes factores de transcrição mas sabe-se que o factor de transcrição SREBP1 apresenta a possibilidade de activar a sua própria transcrição

devido à presença de um elemento de resposta ao esteroide na região promotora do gene que codifica o SREBP1 (Anderson *et al.*, 2007).

Como já se referiu nos ruminantes os triglicéridos constituem a maior fracção de gordura do leite. A síntese de triglicéridos do leite ocorre na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático liso das células epiteliais mamárias. Os triglicéridos do leite são sintetizados a partir dos ácidos gordos e do glicerol pela via glicerol-fosfato (figura 2). Neste processo dois ácidos gordos ligam-se por uma ligação éster a duas moléculas de acil CoA. Assim, com a intervenção da enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) os ácidos gordos ligados à acil CoA reagem com  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato para formar o ácido fosfatídico. Este, depois da remoção do fosfato, gera o 1,2-diacilglicerol. Ao 1,2-diacilglicerol é adicionado o terceiro ácido gordo, originando assim a formação de triglicéridos e CoA (Akers, 2002). Nos bovinos o gene que codifica a enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase mitocondrial (GPAM) encontra-se numa região do cromossoma 26 que parece afectar a produção de leite, de gordura e de proteína do leite, pelo que sugerem que devido à sua localização este seria um bom gene candidato no estudo de *Quantitative Trait Loci* (QTLs) para estes caracteres (Roy *et al.*, 2006).

Nos últimos anos têm sido identificados genes candidatos, que se supõem responsáveis por uma determinada quantidade de variação genética que influencia a produção de leite. No metabolismo dos ácidos gordos destacam-se alguns genes que codificam enzimas envolvidas directamente neste processo. A enzima acetil-CoA carboxilase é determinante na regulação da síntese dos ácidos gordos nos tecidos animais. Diferenças na expressão deste gene na glândula mamária em duas raças de ovelhas parecem indicar um envolvimento directo deste gene na síntese de ácidos gordos. Foram identificadas diferenças ao nível do promotor deste gene mas ainda não foram investigados os efeitos destas diferenças. Também o gene que codifica a enzima esteroil-CoA desaturase, essencial na síntese dos ácidos gordos insaturados, parece indicar que este será um bom gene candidato para estudos da qualidade da gordura do leite. Igualmente se propõem como candidato o gene que codifica a enzima lipoproteína lipase. Esta enzima é responsável pela hidrolização dos triglicéridos a glicerol e a ácidos gordos livres. É sintetizada nas células epiteliais mamárias e influencia a libertação dos ácidos gordos no tecido mamário. Nas ovelhas o gene que codifica a enzima acilCoA-diacilglicerol-aciltransferase 1 (DGAT1) também parece ser um bom candidato para o

conteúdo de gordura do leite. Esta enzima parece controlar a síntese de triglicéridos no tecido adiposo (Grisart *et al.*, 2004; Graziano *et al.*, 2005; Moiola *et al.*, 2007; Szyda e Komisarek, 2007).



**Figura 2.** Síntese de triglicéridos. Enzima Glicerol-3-Fosfato Aciltransferase (GPAT) (Adaptado de Schmidt, 1971).

### 7.3. Síntese da lactose do leite

O disacárido de lactose é o hidrato de carbono mais comum do leite. É constituído por uma molécula de glucose e uma de galactose, combinadas com ligações de um a quatro carbonos. Uma das enzimas funcionais necessárias para a síntese de lactose, a lactose sintetase, é composta por uma combinação de duas proteínas, que se juntam no aparelho de Golgi. A enzima UDP glucose-4-epimerase implicada na transformação de glucose – a lactose – está presente no tecido mamário antes do parto, mas a actividade aumenta no início da lactação. Ao contrário, a actividade da lactose sintetase aumenta fortemente nos estados finais da lactogénese. A capacidade de



sintetizar lactose depende da presença da proteína  $\alpha$ -lactalbumina nas células mamárias. A expressão do gene da  $\alpha$ -lactalbumina aumenta com a lactogénese. Uma vez que a  $\alpha$ -lactalbumina sintetizada é segregada no leite, a produção de lactose necessita de uma produção contínua de  $\alpha$ -lactalbumina para gerar o complexo funcional enzimático lactose sintetase (Akers, 2002).

## **8. Factores que influenciam a produção láctea nos ovinos**

A produção de leite na ovelha depende de factores intrínsecos, inerentes ao animal (de modificação difícil), e de factores extrínsecos ou do ambiente (que podem ser influenciados por intervenção do homem). Tanto uns como os outros podem actuar isoladamente ou em combinação, sendo necessário a utilização de modelos animais (ex: BLUP) para apreciar separadamente a influência de cada um e fazer assim uma previsão do valor genético dos animais (Ugarte *et al.*, 2002).

Como factores intrínsecos capazes de influenciar a produção de leite nos ovinos cabe destacar o genótipo e potencial produtivo (raça) assim como o estado de lactação uma vez que nas ovelhas a produção de leite diária varia ao longo da lactação (curva de lactação) (Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005).

A idade e número de lactação também se considera como factor intrínseco que intervém a produção de leite. Num estudo realizado em três rebanhos de ovelhas Churra da Comunidade Autónoma de Castela e Leão, observou-se que na segunda lactação a produção de leite foi 11,7 kg superior à primeira, sendo esta diferença altamente significativa. Na terceira lactação as produções também foram significativamente superiores (4,2 kg) à segunda (Carriedo *et al.*, 1982). Também El-Saied *et al.* (1999) afirmam que a produção de leite em ovelhas Churra aumenta gradualmente com o número de partos, obtendo-se a máxima produção no terceiro parto e persistindo sem diferenças significativas até quinto, diminuindo a partir deste.

É igualmente considerado como factor intrínseco, o tipo de parto (simples ou múltiplo), sendo frequentes os partos múltiplos em ovelhas com aptitude láctea (Carriedo *et al.*, 1982). No trabalho realizado por El-Saied *et al.* (1999) em ovelhas Churra observou-se que ovelhas com partos múltiplos apresentam uma maior produção de leite (140 l por lactação, média de 120 dias), em comparação com outras que têm

partos simples (128 l). Este aumento na produção poderá dever-se em parte ao efeito da placenta no desenvolvimento da glândula mamária durante a gestação, assim como ao aumento da estimulação do úbere provocada pelos cordeiros (El-Saied *et al.*, 2005).

A anatomia e morfologia do úbere são factores intrínsecos dos animais que parecem influenciar a quantidade de leite produzida uma vez que as características morfológicas influenciam, sobretudo, a apetência pela ordenha mecânica das ovelhas leiteiras, surgindo por esta razão o interesse pelo estudo do úbere da ovelha, em busca de uma morfologia que se adapte melhor a este sistema de ordenha. A hereditariedade dos caracteres relacionados com a morfologia mamaria é no caso da raça Churra relativamente baixa comparativamente com outras raças europeias estudadas (Sierra, 1995; Casanova *et al.*, 1996; De La Fuente, 2000).

Nas ovelhas, o estado sanitário do úbere é um factor intrínseco que tem uma grande influência na produção de leite, tanto na quantidade como na qualidade. A presença de mamites dá origem a uma diminuição na produção e na quantidade de gordura, de caseínas e de lactose. Os animais com maior capacidade produtiva, assim como os que são tratados em condições deficientes, apresentam um maior risco de patologias mamárias. Habitualmente, como indicador de mastites subclínicas utiliza-se a contagem de células somáticas do leite (Casanova *et al.*, 1996; Othmane *et al.*, 2002; Leitner *et al.*, 2004). A contagem de células somáticas do leite é frequentemente utilizada nos programas de melhoramento de bovinos como critério para melhorar a resistência a mastites, embora a relação genética entre ambos os caracteres não indique que sejam exactamente o mesmo carácter. Esta relação foi ainda menos estudada nos ovinos leiteiros devido fundamentalmente à existência de poucos dados relacionados com as mastites mas também porque as mastites clínicas apresentam uma incidência próxima dos 5%. No entanto, trabalhos realizados sugerem que em ovinos de leite é possível realizar uma selecção contra mastites utilizando como indicador a contagem das células somáticas. A hereditariedade estimada para a contagem de células somáticas é baixa para as raças de ovinos estudadas (El-Saied *et al.*, 1999; Ugarte *et al.*, 2002; Othmane *et al.*, 2002).

Como factor extrínseco que influencia a produção de leite considera-se o número de cordeiros criados uma vez que ovelhas que amamentam mais de um cordeiro alcançam o máximo de produção mais elevado e mais precoce (segunda e terceira

semanas) do que as de uma só cria (quarta semana) (Carriedo *et al.*, 1982; el-Saied *et al.*, 1998; el-Saied *et al.*, 1999).

O desmame, a ordenha mecânica assim como as características da ordenha são também factores extrínsecos que influenciam a produção de leite das ovelhas (Casanova *et al.*, 1996; McKusick *et al.*, 2001; Hervas *et al.*, 2006).

## B. Conceitos básicos da expressão de genes

### 1. Regulação da transcrição

#### 1.1. Introdução

A informação genética que determina a composição, a estrutura e a função das proteínas celulares encontra-se nas sequências de bases do DNA. Nos eucariontes, uma complexa máquina celular é responsável pela síntese de proteínas. O primeiro passo neste processo consiste na transcrição do DNA para RNA mensageiro (mRNA). Um segundo passo permite a tradução do mRNA em proteínas (figura 3). A regulação da transcrição e da tradução, assim como os mecanismos que aumentam ou diminuem a expressão dos genes, permitem a diferenciação das células em organismos multicelulares com capacidade de se adaptar a alterações fisiológicas e ambientais. Ainda que seja importante a regulação da transcrição e da tradução para controlar a expressão dos genes, nesta revisão concentramo-nos mais no estudo da regulação da transcrição, uma vez que o nosso objectivo é a análise da expressão a nível do mRNA (Lorkowski e Cullen, 2003).

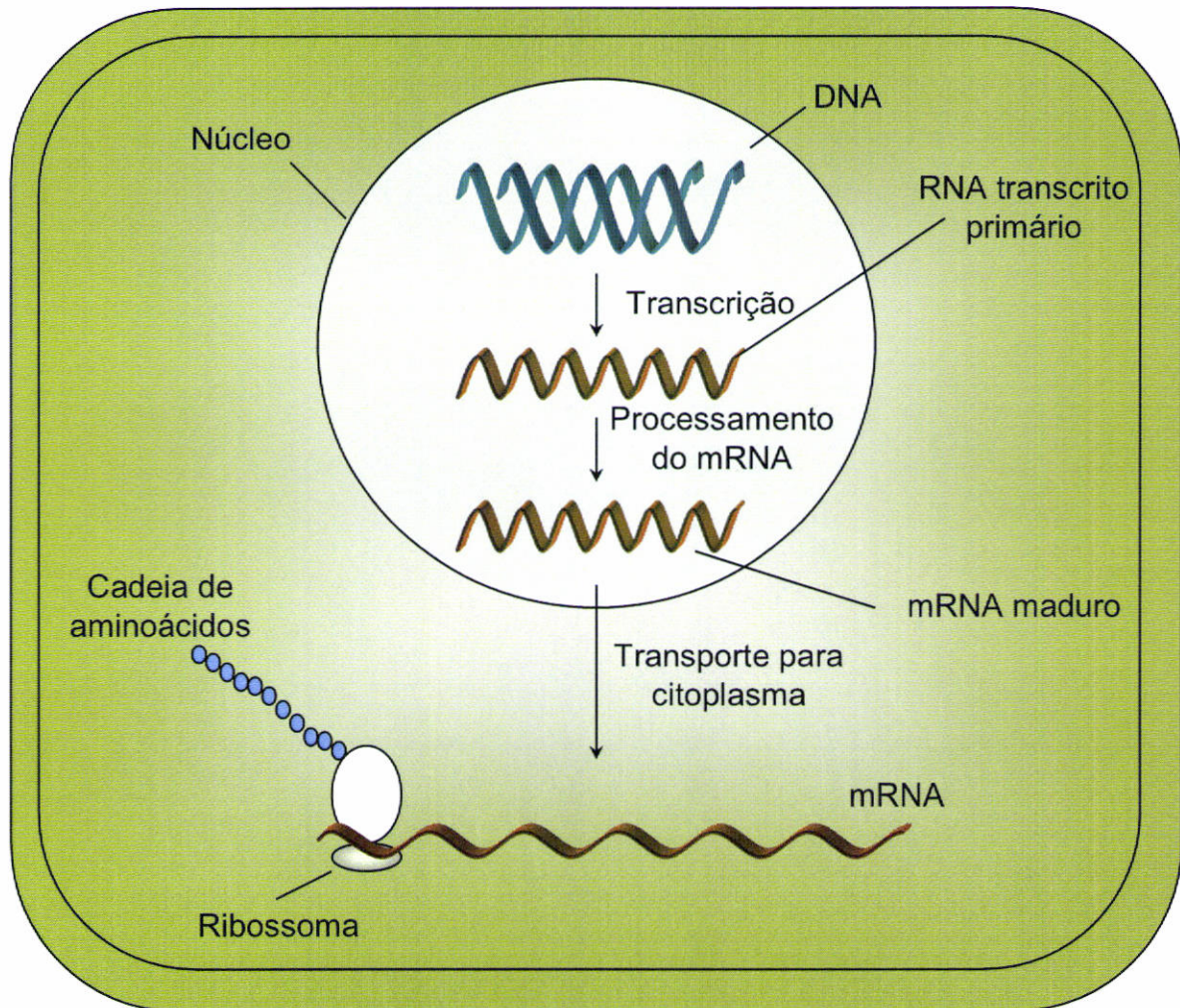
A expressão dos genes nas células dos eucariontes é regulada em diferentes etapas do processo biológico, desde o DNA até às proteínas activas. Foram identificados oito pontos de regulação da expressão genética: (i) iniciação da transcrição; (ii) alargamento da transcrição; (iii) processamento do RNA (ex. *splicing*, poliadenilação); (iv) transporte do RNA do núcleo para o citoplasma; (v) estabilidade do RNA (ex. poliadenilação adicional); (vi) tradução do mRNA para proteínas; (vii) degradação das proteínas; (viii) modificação das proteínas depois de tradução (figura 4) (Alberts *et al.*, 1996; Lorkowski e Cullen, 2003).

Nos capítulos seguintes descreve-se os princípios da regulação da expressão dos genes dando maior atenção aos processos que foram anteriormente enumerados do (i) ao (v), uma vez que nos parecem mais importantes para a compreensão do trabalho realizado.

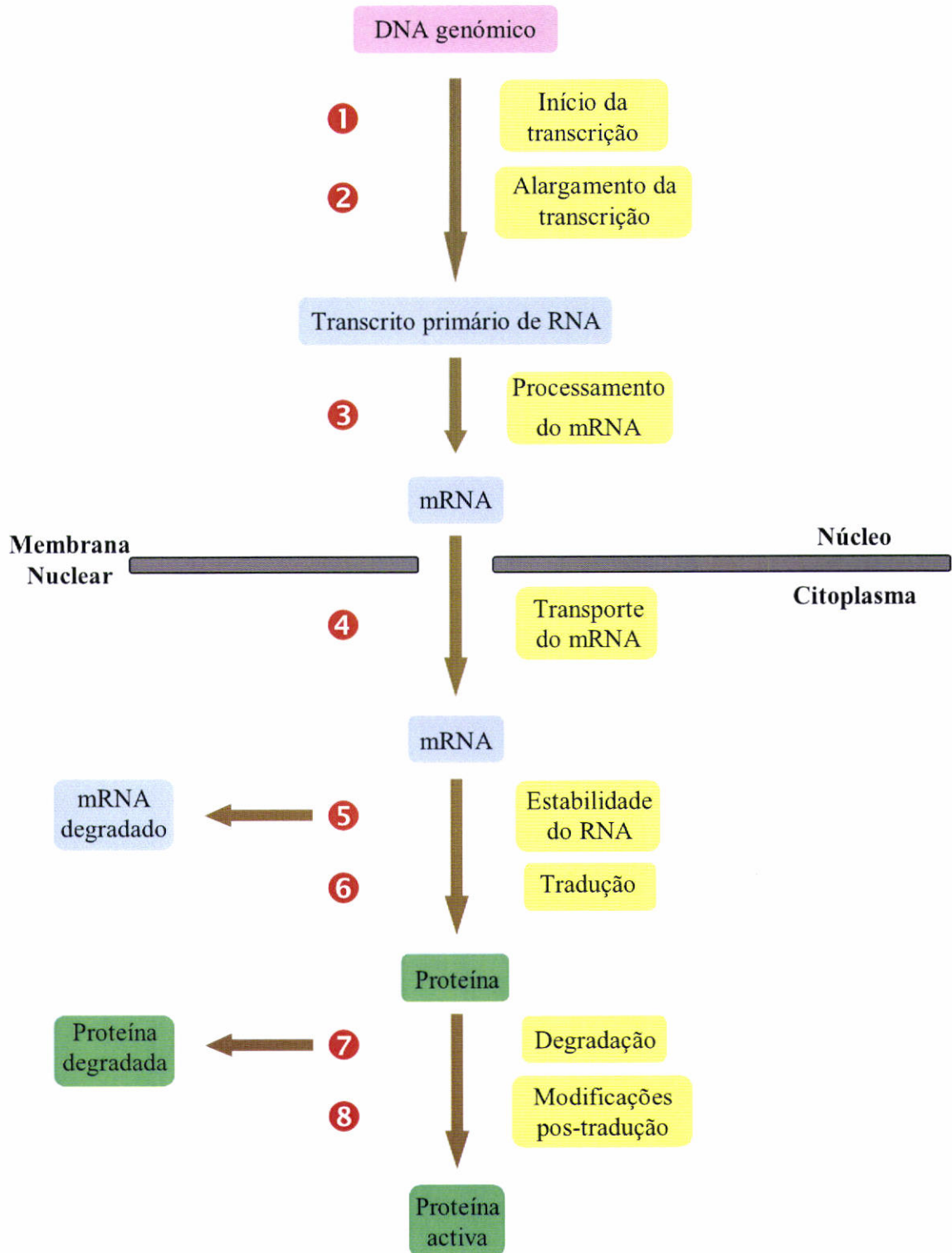
A transcrição é o primeiro e o mais importante nível de regulação da expressão dos genes. Com excepção de um número pequeno de genes nos quais a tradução se



regula depois da transcrição, a taxa de síntese de proteínas está, de maneira geral, correlacionada com a taxa de transcrição. Frequentemente, variações no transcriptoma de uma célula (perfis de expressão do mRNA) reflectem-se em variações equivalentes do proteoma (perfis de expressão de proteínas) (Lorkowski e Cullen, 2003; Lloyd e Murray, 2006; Groenen e van den Heuvel, 2006).



**Figura 3.** Expressão dos genes nas células dos eucariontes. (J. E. Darnell, Jr., “The Processing of RNA” Copyright © 1983 de Scientific American, Inc em Griffiths *et al.*, 2002.).



**Figura 4.** Oito pontos de regulação da expressão dos genes (Alberts *et al.*, 1996; Lorkowski e Cullen, 2003).

## 1.2. Mecanismo de transcrição e promotores centrais

O processo de transcrição no núcleo dos eucariontes é realizado por três polimerases de RNA distintas, polimerases de RNA I, II e III (polimerase I, II e III). Cada uma das polimerases de RNA dos eucariontes é responsável pela transcrição de diferentes grupos de genes (Fan *et al.*, 2005). A polimerase I sintetiza o RNA ribossómico de tamanho grande (Walgraffe *et al.*, 2005) e a polimerase II transcreve os genes que codificam proteínas, logo, o mRNA, (Shilatifard, 1998), enquanto a polimerase III sintetiza RNA de pequeno tamanho, como o RNA transferente e os RNA nucleares e celulares de tamanho pequeno, assim como o RNA ribossómico 5S (Mauger e Scott, 2004).

O processo de transcrição pode ser dividido em diferentes etapas. A primeira etapa de um gene que nunca foi transcrito consiste no reconhecimento do promotor pelos factores de transcrição. Enquanto para os genes transcritos pela polimerase I e para a maioria dos genes transcritos pela polimerase III é unicamente necessário um conjunto-base de factores de transcrição, para a polimerase II é também preciso o Mediador e um número grande de factores específicos para cada gene. Os factores de transcrição específicos nem sempre comunicam directamente com os mecanismos de transcrição basais, necessitando de intermediários (co-activadores), que podem ser diferentes complexos como o mecanismo de remodelação da cromatina ou os de acetilação da cromatina, libertando assim a repressão da cromatina (Jones e Kadonaga, 2000; Gustafsson e Samuelsson, 2001; Lorkowski e Cullen, 2003; Boeger *et al.*, 2005). Numa segunda etapa de iniciação da transcrição forma-se um complexo de pré-iniciação (PIC), constituído pelo complexo de factores de transcrição e pelo promotor de DNA. Cada uma das polimerases reconhece o seu PIC e associa-se a este, formando o complexo de iniciação. Forma-se então um complexo aberto que resulta da separação das duas cadeias do DNA próximas do lugar de início e a polimerase de DNA transcreve RNA pequenos sem deixar o promotor. Seguidamente a polimerase de RNA isomeriza-se para iniciar a fase de alargamento da transcrição. No início da fase de alargamento libertam-se do promotor alguns factores de transcrição basais. Forma-se então um complexo de alargamento estável, constituído pela cadeia de DNA, a polimerase de RNA e o RNA. O processo de alargamento não é monótono, uma vez que



porções de um dado gene se transcrevem mais rapidamente do que outras, sendo inclusivamente possível que a polimerase de RNA se interrompa no meio deste processo, necessitando, algumas vezes, da acção dos factores de alargamento da transcrição nos promotores. No fim da transcrição a polimerase reconhece o sinal de término, libertando o RNA e separando-se de seguida da cadeia de DNA que lhe serviu de molde. Depois da libertação do RNA a polimerase é reciclada. Cada um dos passos de transcrição pode ser regulado e cada uma das proteínas que participam no processo pode ser alvo de activadores ou de repressores (Lorkowski e Cullen, 2003; Armache *et al.*, 2005).

A maquinaria de transcrição da polimerase de RNA II é constituída por três componentes: uma polimerase, capaz de sintetizar RNA e corrigir o RNA sintetizado; um conjunto de cinco factores gerais de transcrição, designados por TFIIB, -D, -E, -F e -H responsáveis pelo reconhecimento do promotor e pelo desdobramento do promotor de DNA e um Mediador de 20 subunidades, que traduz a informação de regulação das proteínas activadoras e repressoras para a polimerase II. O complexo Mediador é exclusivo dos eucariotas e permite uma regulação muito complexa que possibilita o desenvolvimento de organismos multicelulares complexos. No entanto, a pesar de se ter observado que o Mediador envolve a polimerase II permitindo a existência de muitos pontos de contacto através dos quais a informação de regulação pode chegar até à polimerase, o processo ainda não está esclarecido (Boeger *et al.*, 2005).

As polimerases de RNA são constituídas por várias subunidades (polimerase I- 14; polimerase II- 12 e polimerase III- 17 subunidades). Ainda que se possa observar homologia em algumas subunidades das diferentes polimerases de RNA, apresentam diferentes composições, reflectindo funções especializadas na iniciação, no alargamento e no final da transcrição (Huang e Maraia, 2001).

A transcrição efectuada pela polimerase de RNA I necessita, como antes referido, da formação do PIC. Este PIC inclui a ligação dos factores USB (*upstream-binding factor*) e SL1 (*selectivity factor*) aos elementos promotores. O SL1 contém a TBP (proteína de ligação ao promotor TATA) e os factores associados à TBP (TAF - *TBP-associated factors I*- TAF110, TAF163 e TAF148). O factor SL1 interacciona com o promotor de forma sequencial específica. O PIC recruta uma sub-fracção da polimerase de RNA I que é competente para iniciar a transcrição e que se caracteriza pela presença



do factor TFI-IA (factor de iniciação da transcrição IA/Rn3). Desta forma se inicia a transcrição nos genes de RNA ribossómico de grande tamanho (Prieto e McStay, 2005).

Os genes transcritos pela polimerase de RNA III são, por característica, pequenos e apresentam elementos promotores intragénicos (caixas A, B e C). A síntese de RNA pela polimerase de RNA III necessita da cooperação de diferentes factores de transcrição (TF), como o TFIIA, o TFIIB e o TFIIIC, para a ligação com os elementos dos promotores. O TFIIIC é o primeiro a ser recrutado para a síntese de RNA de transferência (interactua com as caixas A e B), juntando-se depois o TFIIB, que contém, numa das subunidades, a proteína de ligação ao promotor TATA. A polimerase de RNA III reconhece um dos factores do TFIIB, formando então o complexo de iniciação. Na síntese de RNA ribossómico 5S é também necessário o factor de transcrição TFIIA para o reconhecimento directo do promotor, sendo considerado um factor de transcrição específico (Geiduschek e Kassavetis, 2001; Huang e Maraia, 2001; Lorkowski e Cullen, 2003; Shivaswamy *et al.*, 2004).

A polimerase de RNA II, o Mediador e um conjunto de outros factores, incluindo os cinco factores gerais de transcrição (TFIIB, D, E; F, e H), trabalham em conjunto para formar o PIC no promotor central, permitindo o início da transcrição. O complexo formado pela a polimerase de RNA II, o Mediador e os factores gerais de transcrição para além de reconhecer o promotor de DNA e de ser capaz de responder à informação de regulação também sintetizam o início do transcrito de RNA. Os factores de transcrição TFIIB e TFIID são responsáveis pelo reconhecimento do promotor e pela interacção com a polimerase II, formando um complexo de iniciação mínimo, que em determinadas circunstâncias é capaz de realizar a transcrição. A caixa TATA do promotor liga-se ao complexo de iniciação pela subunidade TBP do TFIID, que dobra o DNA em volta do domínio terminal C do TFIIB (TFIIBc). O domínio terminal N do TFIIB (TFIIBn) interactua com a polimerase II (Bushnell *et al.*, 2004). Este complexo é então reconhecido pelos factores de transcrição TFIIE e TFIIH, completando a formação do complexo de pré-iniciação da polimerase II (Lorkowski e Cullen, 2003; Müller e Tora, 2004; Bushnell *et al.*, 2004; Boeger *et al.*, 2005).

Pode-se comparar o domínio terminal carboxil (CTD) da subunidade maior da polimerase de RNA II com o da polimerase I e III. O CTD é composto por repetições da sequência consenso YSPTSPS. Este domínio, na polimerase de RNA II é um “ponto de

aterragem” para as proteínas ou para os complexos proteicos que regulam a transcrição e o processamento do mRNA. O domínio CTD é fosforilado extensivamente por três diferentes quinases, activadas por diferentes ciclinas. Durante o ciclo de transcrição, o estado fosforilado do CTD varia de hipo-fosforilado, no início da transcrição, a hiper-fosforilado, no período de alargamento. Esta modificação é afectada pelo factor geral da transcrição TFIID (Lorkowski e Cullen, 2003; Hausmann *et al.*, 2005).

Ainda que alguns factores específicos da transcrição possam actuar pelo recrutamento do TFIID, observou-se que o complexo de multiproteínas ligado ao CTD (mediador da activação da transcrição) é o alvo principal dos activadores específicos dos genes. O mediador funciona, pelo menos em parte, como um co-activador, uma vez que liga factores genéticos específicos à maquina de transcrição e liberta a repressão causada pela cromatina (Lorkowski e Cullen, 2003).

O início do alargamento da transcrição ocorre depois do complexo de iniciação se formar e sofrer alterações. O primeiro passo no início do alargamento é a separação das duas cadeias de DNA próximas do sítio de início da transcrição, para formar um complexo aberto. Este passo necessita do factor TFIIE e da actividade da helicase dependente de ATP do factor TFIIH. No início, a polimerase de RNA II rapidamente sintetiza pequenos RNA, de três a oito nucleótidos, sem se movimentar ao longo da cadeia de DNA. De seguida, o CTD é fosforilado pelo factor TFIIH e começa o alargamento. De todos os factores, o único que fica associado ao promotor é o TFIID. Os outros factores dissociam-se do promotor durante a transição, entre o início e o alargamento (Lorkowski e Cullen, 2003).

As RNA polimerases I, II e III são capazes de se movimentar no DNA para a frente e para trás na cadeia de DNA. Os movimentos para a frente são favorecidos pela ligação de nucleósido trifosfato (NTPs), enquanto que movimentos para trás ocorrem especialmente quando a enzima encontra um impedimento tal como o DNA danificado (Wang *et al.*, 2006). A enzima polimerase de RNA II é capaz de realizar um processo designado por “*backtracking*” (retrocedimento da enzima polimerase na cadeia molde de DNA). Este retrocedimento é essencial na recuperação de pausas, para além de permitir expor o DNA danificado para reparar, e possivelmente para a comprovação do transcrito de RNA. Nos seres humanos defeitos na pausa e na recuperação da transcrição é muitas vezes causador de doenças (Boeger *et al.*, 2005).

Estudos realizados com raio-X pela equipa de Kornberg permitiram em parte esclarecer o processo que permite às polimerases de RNA durante a transcrição seleccionar os nucleótidos. Sabe-se que o emparelhamento de bases, assim como a ligação dos hidrogénios aos grupos hidroxil da ribose, não são suficientes para se conseguir o grau de selectividade observada. Por exemplo, foi demonstrado que um ribonucleotídeo se incorpora no RNA várias vezes mais rapidamente do que 2'-deoxirribonucleosídeo. A base desta especificidade extraordinária consiste num elemento estrutural da polimerase de RNA II que se designa por *trigger loop*, que torna possível o contacto directo e indirecto com os nucleótidos no centro activo da polimerase. O *trigger loop* detecta a correcção da topologia de um par híbrido de RNA-DNA e para além de excluir os erros de ligação purina-purina e pirimidina-pirimidina também exclui erros de ligação 2'-deoxirribonucleosídeo, devido a diferenças significativas que ocorrem nos parâmetros das hélices DNA-DNA e RNA-DNA. O *trigger loop* move-se correctamente por baixo do nucleósídeo trifosfato (NTP) no sitio de adição do nucleótido, formando uma rede de interacções entre a base do NTP, o açúcar, o fosfato e os resíduos da polimerase II. Correctamente posicionado por estas interacções o *trigger loop* pode originar a formação de ligações fosfodiester. O reconhecimento e catalize destas ligações, assegura a fidelidade do processo de transcrição (Wang *et al.*, 2006).

O ciclo de transcrição é um processo complexo, que envolve a intervenção de muitas proteínas. Ainda que o início da transcrição seja a principal etapa para a regulação da transcrição, também o alargamento ou a finalização podem ser regulados, sendo que variações na abundância de transcritos podem reflectir alterações na taxa de cada uma das etapas de transcrição (Lorkowski e Cullen, 2003; Conaway *et al.*, 2005).

### **1.3. Promotores de regulação**

A transcrição da maioria dos genes eucariontes é controlada por proteínas que se ligam a sequências específicas do DNA. Frequentemente o DNA dos eucariontes está armazenado na cromatina, o que bloqueia o acesso das polimerases de RNA aos sítios de início da transcrição de genes. Torna-se então necessária, para o início da transcrição, a ligação de activadores de transcrição a elementos específicos nos promotores de

regulação e nos activadores. A maioria dos genes expressa-se unicamente em determinados tecidos ou durante curtos períodos de desenvolvimento. A activação da maioria dos promotores depende da cooperação de várias proteínas de regulação, originando a formação de complexos de activação, o que garante a especificidade da transcrição. Uma região de algumas centenas de pares de bases próximas do promotor central, designados por promotores de regulação, contém geralmente a maioria dos sítios de ligação aos activadores, que por contraste, são elementos de regulação que se localizam a montante, podendo também, em alguns casos, encontrar-se a jusante do gene ou mesmo nos intrões (Lorkowski e Cullen, 2003).

São necessárias diferentes proteínas para que a polimerase de RNA II se ligue eficientemente aos promotores. Estas podem ser classificadas do seguinte modo: i) factores de transcrição básicos necessários em todos os promotores; ii) activadores *trans*, constituídos por proteínas que se ligam a activadores e a sequências activadoras situadas a montante; iii) co-activadores, como o factor de transcrição II D (TFIID), que não se ligam ao DNA mas que indirectamente suportam a interacção dos activadores *trans* com o complexo da polimerase de RNA II (Lorkowski e Cullen, 2003).

#### **1.4. Sequências incrementadoras ou activadoras**

As sequências incrementadoras ou activadoras são regiões relativamente curtas de DNA, contendo múltiplos sítios de ligação para as proteínas que activam a transcrição (reguladoras). Estas, depois de se ligarem a uma sequência activadora, provavelmente originam a remodelação da cromatina e a formação de um *loop*. Isto permite ao complexo activador interactuar com o promotor central, considerando-se que a função principal das sequências incrementadoras poderá ser a criação da estabilidade no complexo de transcrição (Struhl, 2001; Lorkowski e Cullen, 2003).

Na transcrição é necessária a acção combinada e sinérgica de muitas proteínas reguladoras, que se ligam às sequências incrementadoras. Foi observado que combinações de proteínas reguladoras diferentes apresentam capacidade de acção sinérgica na transcrição, sendo possível que um número limitado de proteínas reguladoras seja ordenado em muitas combinações possíveis, cada uma das quais biologicamente diferentes. As sequências incrementadoras exercem “acção à distância”,



independentemente de se encontrarem a montante ou a juzante do promotor central do gene-alvo, sendo possível também que alguns genes sejam controlados por sequências incrementadoras, localizadas dentro das regiões transcritas pelo aparelho de transcrição (Ogbourne e Antalis, 1998; Struhl, 2001; Luster e Rizzino, 2003).

Um dado gene pode ser regulado por múltiplas sequências activadoras, sendo então influenciado por múltiplas proteínas reguladoras, cujos sítios-alvo podem estar dispersos ao longo do cromossoma. As proteínas reguladoras individuais podem estar restritas a um tipo de células específicas, operando unicamente em determinados estados de desenvolvimento e ajustando assim a resposta a sinais ambientais definidos. Portanto, uma sequência activadora é capaz de integrar a informação ambiental e de desenvolvimento para regular a expressão de um gene individual numa forma biológica apropriada (Struhl, 2001).

As sequências incrementadoras que não apresentam uma combinação especial de sítios de ligação às proteínas activadoras designam-se por sequências activadoras modulares. Estas permitem um padrão de expressão dos genes muito diverso, sendo provável que os eucariontes utilizem as sequências activadoras modulares para conseguir diversidade nos padrões de expressão de genes e flexibilidade na evolução. No entanto, não é fácil explicar como uma sequência incrementadora modular pode regular a activação ou a desactivação de transcrição como resposta a factores ambientais. Por isso, as células necessitam de um tipo diferente de sequências incrementadoras, nas quais a ligação de cada proteína activadora é essencial para a transcrição. Estas sequências incrementadoras outorgaram a restrição, de tal forma que cada gene-alvo só estará activo para a transcrição unicamente quando todas as proteínas activadoras estejam funcionalmente activas (Struhl, 2001).

### **1.5. Cromatina**

A armazenagem de todo o genoma dos eucariontes na cromatina proporciona uma forma de compactação permitindo que caiba no núcleo. No entanto, este armazenamento restringe o acesso ao DNA de várias proteínas de regulação essenciais para muitos processos biológicos, tais como a transcrição (Soutoglou e Talianidis, 2002; de la Cruz *et al.*, 2005).

Os nucleossomas, unidades básicas de arquitectura dos cromossomas, constituem-se por oito proteínas estáveis (duas de cada histona H2A, H2B, H3 e H4), à volta das quais se envolvem aproximadamente 140 bp de DNA (Dean, 2006).

Existem dois mecanismos capazes de balancear a natureza repressiva da cromatina: um desses mecanismos é a alteração da estrutura do nucleossoma por meio de enzimas ou de complexos proteicos (Swi/Snf), utilizando energia da hidrólise do ATP, tendo-se observado recentemente indícios de que estes complexos proteicos são necessários para a transcrição de genes específicos da glândula mamária, como é o caso das caseínas (Xu *et al.*, 2007); o segundo provém da modificação covalente da cauda das histonas como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitação (Soutoglou e Talianidis, 2002; de la Cruz *et al.*, 2005). As alterações que originam estes dois mecanismos “abrem” a cromatina aos processos nucleares como a transcrição (Dean, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

### 1.6. Elementos silenciadores

Considera-se que os elementos silenciadores são pequenas sequências específicas de nucleótidos capazes de exercer repressão na transcrição nos eucariontes. Estas sequências são capazes de recrutar factores de transcrição para o promotor que, por sua vez, realizam funções específicas. Descobriram-se muitos tipos diferentes de silenciadores que apresentam a capacidade de afectar diversos aspectos da regulação dos genes, tais como a retenção no citoplasma de factores de transcrição e a intervenção dos factores de transcrição que actuam de forma positiva, além de exercerem funções na estrutura da cromatina, no *splicing* de intrões, no reconhecimento de sinais 3' não traduzidos e na montagem dos factores gerais de transcrição, para regular diminuindo a expressão genética (Ogbourne e Antalis, 1998; Wray *et al.*, 2003).

Ainda que pareça existir mecanismos de acção diferente entre os silenciadores que se localizam a montante da região do promotor, e silenciadores que se encontram na região do intrão e possivelmente no exão, o exame detalhado do mecanismo de acção permitiu demonstrar que existem dois grupos funcionais distintos. O primeiro desse grupo inclui os silenciadores clássicos, capazes de exercer a sua função independentemente da sua posição relativamente aos elementos sobre os quais actuam,

enquanto o segundo grupo, designado por elementos de regulação negativa (*NRE-negative regulatory elements*), está dependente da sua posição (Ogbourne e Antalis, 1998; Wray *et al.*, 2003).

Existem provas de que os silenciadores são capazes de actuar de forma sinérgica para intensificar ou para modificar a função de repressão, podendo ser uma complexa região de DNA em vez de um só elemento, tornando-se possível que actuem como resultado da conformação do DNA (Ogbourne e Antalis, 1998; Wray *et al.*, 2003).

### **1.7. Factores de transcrição**

Os factores de transcrição são proteínas que se ligam às sequências promotoras activadoras ou aos elementos silenciadores de forma específica para regular (aumentando ou diminuindo) a expressão dos genes (Lorkowski e Cullen, 2003). O nível de controlo imposto pelos vários factores de transcrição é muito complexo (Lemon e Tjian, 2000). Uma vez que existem mais de 2 000 factores de transcrição, pensa-se que na regulação da polimerase de RNA II actuam em sub-conjuntos únicos para cada gene, assegurando uma quantidade de proteína correcta no momento apropriado (Brivanlou e Darnell, 2002).

Os factores de transcrição envolvidos na regulação da transcrição de forma positiva podem ser classificados em factores gerais (que constituem o núcleo activo) e em factores de regulação da transcrição. Ainda que os factores gerais não estejam implicados na alteração da taxa de transcrição dos genes de forma individual, encontram-se envolvidos em todos os processos de transcrição, enquanto os factores de regulação são responsáveis pelo tempo de expressão de determinados genes em situações definidas, como ocorre no desenvolvimento do embrião, ou como resposta a sinais que podem provir de receptores de esteróides mas também de outros sinais internos ou externos (Brivanlou e Darnell, 2002; DeJong, 2006).

O primeiro factor de transcrição caracterizado bioquimicamente foi o TFIID. Este é um dos factores de transcrição gerais mais importantes, uma vez que a sua associação com o promotor é um dos passos iniciais para a montagem da polimerase de RNA II. O factor TFIID contém a proteína de ligação à sequência TATA. A interacção da proteína de ligação à sequência TATA com o DNA leva à “curvatura” da dupla

hélice de DNA, seguida da cascata de interações com os pequenos factores associados designados por TAF (*tightly associated factors*) e com várias proteínas de regulação e de estabilização. O início do mecanismo da polimerase II é complexo, sendo necessários até 40 factores de transcrição diferentes, tais como o TFIIA, TFIIB, TFIIC, TFIID, TFIIH entre outros (Dymlacht *et al.*, 1991; Lemon e Tjian, 2000; Lorkowski e Cullen, 2003). Também foram isolados bioquimicamente factores de transcrição que se ligam a sequências específicas do DNA como a proteína-1 específica (Sp1), a família de proteínas activadoras (AP-1), proteínas que se ligam à sequência activadora CCAAT (C/EBP), receptores de esteróides (glucocorticóides ou GR) e factores de transcrição específicos de tecidos (NF-κB), entre outros (Lemon e Tjian, 2000).

As outras RNA polimerases envolvidas na transcrição dos eucariontes, RNA polimerase I e RNA polimerase III, também necessitam de factores gerais de transcrição para iniciar a transcrição. Ainda que a TBP seja um factor geral de transcrição comum às três polimerases, os outros factores são distintos dos que se montam nos promotores da polimerase II. As polimerases I e III necessitam dos factores gerais de transcrição como o USF (*upstream binding factor*), o SL1, o TFIIA, o TFIIB e o TFIIC, assim como muitos outros factores proteicos que promovem o complexo de iniciação destas polimerases (Huang e Marais, 2001; Geiduschek e Kassavetis, 2001; Fan *et al.*, 2005).

Mas as células também necessitam de mecanismos que regulam a transcrição de forma negativa. Um dos mecanismos de regulação negativa dos genes consiste na manutenção no citoplasma dos factores de transcrição no estado latente (fosforilados), pelo que lhes é bloqueada a entrada no núcleo. Alguns factores podem ser fosforilados enquanto se encontram no núcleo celular, o que resulta numa diminuição do potencial de activação da transcrição. A rápida activação e a desactivação da transcrição dos genes podem ser conseguidas pela activação e pela desactivação dos factores de transcrição por meio da fosforilação e da desfosforilação (Karin e Hunter, 1995; Brivanlou e Darnell, 2002; Lorkowski e Cullen, 2003).

### **1.8. Epigenética**

A epigenética define-se como o estudo das alterações que se herdam e que não são influenciadas a nível das sequências de DNA (Waddington, 1942). A regulação



epigenética, além de gerar diversidade do tipo celular no desenvolvimento dos mamíferos, é também importante na manutenção da estabilidade e da integridade dos perfis de expressão dos diferentes tipos celulares. Estas alterações epigenéticas são herdadas e, embora sejam geralmente mantidas de forma estável, são potencialmente reversivas (Cheung e Lau, 2005; Shilatifard, 2006).

Estudos sobre a epigenética têm-se centrado em mecanismos como as modificações na cromatina e a metilação do DNA (Cheung e Lau, 2005). Estudos relativos à dinâmica da cromatina relacionam as modificações das histonas com a regulação epigenética. São conhecidas modificações na fileira das histonas – acetilação, fosforilação, *sumoylation*, ubiquitinação e metilação. Enquanto as duas primeiras são reversivas e dinâmicas, muitas vezes associadas à expressão de genes individuais, as restantes modificações, como a metilação, são mais estáveis, estando associadas à manutenção da expressão de determinadas regiões do genoma durante largos períodos (Cheung e Lau, 2005; Shilatifard, 2006).

Um importante mecanismo de regulação epigenética é a metilação de regiões de DNA ricas em bases GC. A metilação destas regiões a montante dum determinado gene silencia-o, sendo este mecanismo essencial no desenvolvimento embrionário uma vez que está associado à inactivação nas células das fêmeas do cromossoma X (Lorkowski e Cullen, 2003).

Estão igualmente associados à regulação epigenética das famílias de proteínas os grupos das *Trithorax* (TRX) e das *Polycomb* (PcG). Estas duas classes de proteínas, que se associam à cromatina controlando a sua estrutura, funcionam activando e reprimindo a expressão dos genes, respectivamente (Shilatifard, 2006).

## 2. Regulação depois da transcrição

### 2.1. Regulação da estabilidade e da degradação do mRNA

A regulação da degradação do mRNA nos eucariontes superiores é um ponto importante no controlo da expressão de genes. A estabilidade de determinados mRNA é controlada pela interacção específica entre os elementos estruturais e as proteínas ligadas ao RNA, que podem ser gerais ou específicas do mRNA. A regulação da estabilidade do mRNA é obtida através de flutuações da sua vida em resposta a estímulos resultantes do desenvolvimento ou da diferenciação, da regulação hormonal, de variações diárias ou de stress (Guhaniyogi e Brewer, 2001; Tourriere *et al.*, 2002).

Os níveis de mRNA citoplasmático resultam do equilíbrio entre a taxa de síntese de RNA nuclear, o processamento, a exportação e as taxas de degradação do mRNA citoplasmático (Guhaniyogi e Brewer, 2001).

Embora existam diferentes vias biológicas para degradar diferentes mRNA, um determinado transcrito pode ser degradado por diversas vias biológicas aparentemente redundantes, dependendo das condições celulares (Guhaniyogi e Brewer, 2001).

A regulação da degradação do mRNA é obtida pela interacção orquestrada entre os componentes estruturais do mRNA e factores específicos de acção *trans*. Estes componentes estruturais incluem o capuz na extremidade 5', a região 5' não traduzida (UTR), as regiões que codificam proteínas, a fileira de poli (A) no extremo 3' e a região 3' UTR (Guhaniyogi e Brewer, 2001; Tourriere *et al.*, 2002).

O mRNA da maioria dos mamíferos apresenta uma fileira de poli (A) que desenvolve funções diversas, entre as quais se encontra a regulação da degradação do mRNA. A eliminação ou a redução desta fileira é o primeiro passo na degradação do mRNA em muitos mamíferos, observando-se que a ligação desta fileira com a proteína de ligação à fileira de poli (A) (PABP- *poly(A)-binding protein*) desenvolve uma importante função na protecção do mRNA ao ataque das ribonucleases. Além disso, a fileira de poli (A) facilita a tradução e esta influencia a estabilidade do mRNA (Staton *et al.*, 2000; Guhaniyogi e Brewer, 2001; Tourriere *et al.*, 2002).

Nos mamíferos, como noutros seres vivos, a eliminação do capuz na extremidade 5', parece permitir a degradação do mRNA por influência das exonucleases

5'-3' e 3'-5'. A taxa de eliminação do capuz está afectada por distintos factores, entre os quais o comprimento da fileira de poli (A) (Guhaniyogi e Brewer, 2001; Tourriere *et al.*, 2002; Lotan *et al.*, 2005).

Alguns mRNA de mamíferos são degradados pela actividade de endonucleases, independentemente da fileira de poli (A). Estas endonucleases podem desenvolver importantes funções na resposta dos organismos a infecções (Guhaniyogi e Brewer, 2001).

Determinadas sequências que se localizam no mRNA e proteínas com actuação *trans* também podem controlar a degradação dos transcritos. Estas sequências podem estar localizadas nos elementos 3' UTR. Entre estas incluem-se os elementos de resposta ricos em AU (ARE- *AU-rich response elements*) e as proteínas que se ligam a estes. Também se incluem neste grupo os elementos que respondem ao ferro (IRE- *iron-reponsive elements*) e as proteínas reguladoras do ferro (IRP- *iron regulatory protein*) (Ross, 1995; Guhaniyogi e Brewer, 2001; Gingerich *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006).

Encontram-se igualmente elementos que controlam a degradação do mRNA nas regiões codificantes. Alguns mRNA, como a  $\beta$ -tubulina, contêm elementos que promovem a degradação dos transcritos na região codificante. A estabilidade da  $\beta$ -tubulina, mas não a da  $\alpha$ -tubulina, é determinada por 13 nucleótidos que codificam quatro aminoácidos deste componente dos microtúbulos (Guhaniyogi e Brewer, 2001).

A região 5'UTR também pode originar alterações da estabilidade do mRNA (Guhaniyogi e Brewer, 2001). Identificaram-se elementos determinantes para a estabilidade do mRNA na região 5'UTR do mRNA de IL-2 (Cheng *et al.*, 2003).

A desregulação na estabilidade do mRNA em humanos pode estar associada com doenças como o cancro ou Alzheimer (Guhaniyogi e Brewer, 2001).

## 2.2. Regulação do alargamento da transcrição

O mecanismo de síntese do mRNA é complexo. Nos últimos anos pôs-se em evidência que o processo de alargamento da transcrição é dinâmico e altamente regulado, capaz de coordenar o transcurso biológico (Shilatifard, 2004; Sims *et al.*, 2004; Gerber *et al.*, 2004).

A regulação do processo biológico de alargamento requer a acção concertada de

muitos factores de alargamento da transcrição, que afectam (positiva ou negativamente) o processo de alargamento dos transcritos realizado pela polimerase de RNA II. Estes factores podem associar-se ao complexo de alargamento de transcritos (TEC- *transcript elongation complex*) de forma permanente ou interactivar de forma passageira. Alguns factores de transcrição actuam de forma global, enquanto outros são necessários para a transcrição de um grupo restrito de genes, o que sugere diferenças subtis na composição dos factores de alargamento. Estes podem actuar afectando directamente a actividade catalítica da polimerase de RNA II e/ou facilitando o alargamento actuando na cromatina, como por exemplo na remodelação dos nucleossomas no passo da polimerase ou modulando as modificações das histonas na região que se está a transcrever. Os factores de transcrição podem encontrar-se ao longo de toda a região de transcrição dos genes activos. Além disso, determinados factores de transcrição interactivam com factores de processamento do RNA, que coordenam fenómenos como a formação do capuz na extremidade 5', o *splicing* e a formação da extremidade 3' (Tolic-Norrelykke *et al.*, 2004; Grasser, 2005).

Descobriu-se que o ciclo de fosforilação do domínio C-terminal (CTD) da subunidade maior da polimerase de RNA II desenvolve funções importantes no recrutamento de factores de alargamento (Grasser, 2005; Morris *et al.*, 2005).

Identificaram-se três grupos distintos de factores de alargamento, de acordo com o modo de actuação. O primeiro é capaz de compensar os bloqueios da actividade catalítica da polimerase de RNA II. Neste grupo encontram-se factores como o TFIIF, a família ELL e a proteína *Elongines*. Pensa-se que estes assistem no alinhamento dos sítios activos da polimerase de RNA II com o extremo 3' do transcrito. Também se incluem neste grupo de factores o DSIF (constituídos por dois dímeros Spt4 e Spt5) e o TFIIS, mas pensa-se que também puderam actuar na cromatina (Winston, 2001; Gerber *et al.*, 2004; Grasser, 2005).

O segundo grupo é constituído por factores que remodelam a cromatina de forma a permitir o alargamento da transcrição. Nestes incluem-se os complexos Swi/Snf, capazes de modular os nucleossomas no passo da polimerase, permitindo o alargamento. Também complexos como FACT (*facilitates chromatin transcription*) e o Spt6 parece estarem envolvidos na manutenção da estrutura da cromatina dos genes activos (Grasser, 2005).

O terceiro grupo de factores de alargamento promove modificações das histonas nas regiões do genoma em que se transcrevem os genes. Entre este grupo de factores encontram-se o complexo *Elongator*, que se associa à RNA polimerase II no processo de alargamento, e a sub-unidade de Elp3, que apresenta actividade de acetil-transferase nas histonas (Grasser, 2005; Morris *et al.*, 2005).

### 2.3. Maturação alternativa do mRNA (*splicing*)

O processo de maturação (*splicing*) que ocorre no núcleo consiste na eliminação das sequências internas não codificantes do RNA (intrões) e na união dos segmentos codificantes (exões) para formar uma sequência contínua que codifica uma cadeia de polipéptidos. A união dos segmentos codificantes pode omitir um ou mais exões e por isso se designa por maturação alternativa do mRNA, sendo este mecanismo considerado como a fonte de origem mais importante de diversidade das proteínas (Stojdl e Bell, 1999; Maniatis e Tasic, 2002; Jeanteur e Tazi, 2005).

A regulação da maturação alternativa pode originar a produção de diferentes proteínas partindo dum único mRNA ou funcionar como activador ou desactivador durante o período de desenvolvimento. Estima-se que 74% dos transcritos primários dos genes humanos são submetidos ao processo de maturação alternativa, muitas vezes regulada por padrões de tempo durante o desenvolvimento normal (Maniatis, 1991; Dralyuk *et al.*, 2000; Park e Graveley, 2005).

A maturação do mRNA é catalizada pelos spliceossomas (constituído por complexo de ribonucleoproteínas contendo cinco RNA nucleares pequenos – snRNA – e um grande número de proteínas associadas). Os spliceossomas reconhecem os sítios de saturação 5' e 3', que se encontram na ligação entre os exões e os intrões. A reacção de saturação ocorre em dois momentos. No primeiro, o extremo 5' do intrão reúne-se com uma adenina numa sequência a montante do sítio de maturação 3' para formar um intermediário que se designa por intrão *lariat*. No segundo momento, os exões ligam-se e liberta-se o intrão *lariat* (Maniatis, 1991; Steitz, 1992; Maniatis e Tasic, 2002).

#### 2.4. Maturação *trans* do mRNA

Em alguns casos o processo de maturação permite a união selectiva de exões que se localizam em diferentes transcritos primários de RNA, de forma a produzir mRNA que codifica proteínas com diversas estruturas e funções (Pirrotta, 2002; Finta e Zaphiropoulos, 2002; Horiuchi e Aigaki, 2006).

Existem sugestões de que este processo de maturação pode ocorrer naturalmente nos eucariontes superiores ou inferiores, o que lhes permite aumentar significativamente a complexidade da expressão genética, podendo ser esta uma forma de manter o genoma “magro” (Pirrotta, 2002; Finta e Zaphiropoulos, 2002).

Várias espécies de variações na maturação *trans* do mRNA foram descritas em mamíferos. Embora não existam provas do seu significado biológico, habitualmente envolvem o extremo 5' de um exão, geralmente não codificante, maturado num transcrito codificante. Os processos de maturação alternativa e *trans* do mRNA utilizam um mecanismo similar catalizado pelos splicessomas (Eul *et al.*, 1996).

#### 2.5. Regulação do transporte de mRNA

As células também podem controlar a síntese de proteínas, regulando o transporte de mRNA do núcleo para o citoplasma, separados por um invólucro de duas membranas. Por meio dos poros nucleares observa-se um transporte entre o núcleo e o citoplasma que se realiza nas duas direcções. Uma vez que o RNA se sintetiza no núcleo, todo o componente citoplasmático de RNA deriva da exportação a partir do núcleo (Alberts *et al.*, 1996; Lewin, 2001; Lorkowski e Cullen, 2003).

A maioria das moléculas de RNA são exportadas para o citoplasma através do complexo de poros nucleares, depois de haverem sido sintetizadas no núcleo (Masuyama *et al.*, 2004).

#### 2.6. Localização intracelular do mRNA

Outra forma de regulação de expressão dos genes é a localização intracelular do mRNA, que permite concentrar a síntese de proteínas na proximidade do sítio em que

actuariam, evitando a síntese em regiões das células em que poderiam ter efeitos deletérios e interferir com a função celular (Tekotte e Davis, 2002; Lipshitz e Smibert, 2002; Van De Bor e Davis, 2004; Chabanon *et al.*, 2004).

A localização sub-celular do mRNA parece também ter uma função importante nos mecanismos pelos quais as células se tornam polarizadas. A localização do RNA proporciona um modo eficiente de restringir determinadas proteínas a compartimentos subcelulares muito precisos, criando, entre outros mecanismos, a polaridade celular. Inicialmente descrita nos oócitos em que polaridade celular é determinante para o desenvolvimento embrionário, também se determinou que a compartimentação do RNA é utilizada pelas células somáticas diferenciadas para determinar e para manter a polaridade (Mohr e Richter, 2001).

Os determinantes moleculares que especificam o transporte do RNA parece serem bastante complexos, implicando diferentes momentos. Antes, o mRNA que se destina ao transporte tem de ser seleccionado entre um grande conjunto de RNA. Existem provas de que esta selecção ocorre no núcleo (Mohr e Richter, 2001).

Frequentemente na região 3' UTR do mRNA existem determinadas sequências curtas, designadas por elementos de actuação *cis*, capazes de actuar como sítio de ligação para um complexo de proteínas que se associam ao mRNA (RNP-ribonucleoproteína), também conhecidas por factores de actuação *trans*, que intervêm no transporte subcelular. Com algumas excepções, estes complexos de riboproteínas (RNP) ligam-se a elementos do citoesqueleto (microfilamentos ou microtubos) que actuam como “carris” nos quais é transportada a “carga” do complexo RNP. Durante o processo de transladação do mRNA é necessário reprimir a tradução, sendo depois preciso desactivar esta repressão quando o mRNA se localiza no sítio adequado à síntese de proteína (Mohr e Richter, 2001; Kloc e Bilinski, 2003; Chabanon *et al.*, 2004; St. Johnston, 2005; Kindler *et al.*, 2005).

## **2.7. Regulação da poliadenilação do mRNA**

A poliadenilação do precursor do mRNA ocorre no núcleo das células eucariontes, sendo então os mRNA poliadenilados transportados para o citoplasma. O processamento do precursor do mRNA no extremo 3' é mais um método de regulação

depois da transcrição, uma vez que o comprimento da cauda de poli (A) está implicado em vários processos do metabolismo do mRNA, incluindo o transporte para o citoplasma, a estabilidade do mRNA e o controlo da tradução do mRNA (Milligan *et al.*, 2005; Nakanishi *et al.*, 2006).

A poliadenilação alternativa é um mecanismo capaz de originar uma variedade de transcritos a partir de um só gene. Mais de metade dos genes humanos apresentam múltiplos sítios de poliadenilação, originando variações no mRNA e nas proteínas produzidas. Estudos realizados permitiram determinar que pode ocorrer poliadenilação alternativa de genes individuais, conforme o tecido. Os factores que actuam de forma *trans* e os elementos de regulação *cis* podem estar envolvidos na regulação da poliadenilação alternativa em diferentes tecidos (Zhang *et al.*, 2005). Isto foi observado em tecidos como no cérebro e nos testículos (Godmann *et al.*, 2005; Costessi *et al.*, 2006). Nos genes humanos mais de 50% apresentam poliadenilação alternativos e em cobaias mais de 32% (Kostadinov *et al.*, 2006).

## 2.8. Interferência de RNA (RNAi)

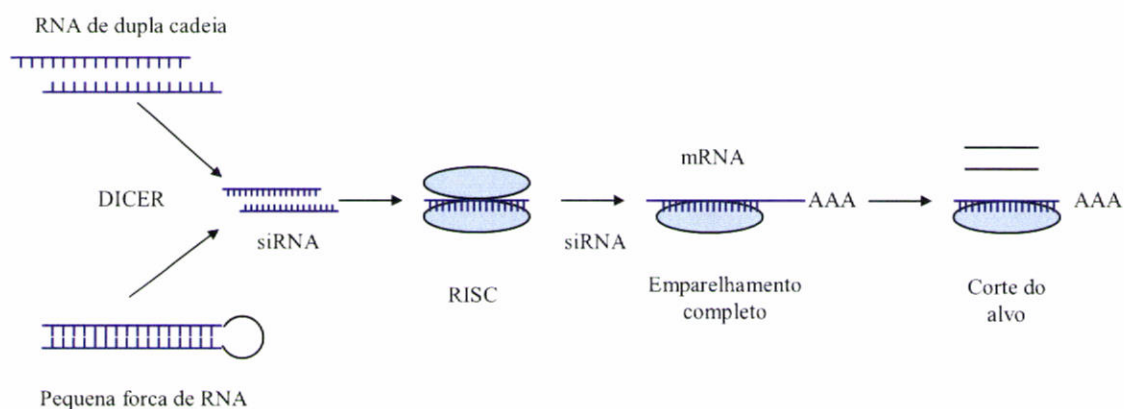
O RNA de cadeia dupla (*double stranded RNA*-dsRNA) pode induzir o silenciamento (pós-transcrição) dos genes, conhecido por interferência de RNA (RNAi-*interference RNA*) (Ullu *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2003; Montgomery, 2004). O processo é desencadeado pela introdução na célula de dsRNA homólogo de um gene. Estes dsRNA são primeiro processados em sequências de 21-25 nucleótidos, por uma endonucleasa específica de dsRNA designada por DICER (membro da família das nucleasas RNasa III). Os dsRNA resultantes, designados por pequenos RNA de interferência (siRNA- *small interference RNA*), associam-se ao complexo de nuclease, denominado por RISC (RISC- *RNA-induced silence complex*). A associação resultante é utilizada como guia para a degradação dependente da homologia do mRNA-alvo (figura 5) (Dudley *et al.*, 2002; Cottrell e Doering, 2003; Cheng *et al.*, 2003; Svoboda, 2004; Storz *et al.*, 2005).

Após a descoberta de que RNA de pequeno tamanho é responsável pelo fenómeno de interferência de RNA, foi observado em vários eucariontes entre os quais mamíferos a existência de uma classe endógena de RNA também de pequeno tamanho e



que se designou por microRNA (miRNA). Os miRNA são capazes de regular a expressão dos genes pelo emparelhamento ao mRNA, resultando na sua degradação ou na supressão da tradução. Estima-se que nos organismos devem existir aproximadamente cerca de 1 a 5% de genes miRNA do total de genes que codificam proteínas e que aproximadamente 30% de todos os genes são regulados por miRNAs, sendo a expressão de muitos miRNA específica de determinados tecidos ou estados de desenvolvimento. É sabido que os miRNA desempenham uma função importante em vários processos biológicos, tal como no desenvolvimento, na sinalização dos processo de transcrição, no cancro entre outras doenças em distintos organismos, sendo os miRNA actualmente considerados como moléculas com uma função importante na regulação da expressão de genes ao nível da pós-transcrição (Calin *et al.*, 2004; Wiedmann *et al.*, 2006, Pillai *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

Esta capacidade que apresentam as dsRNA para destruir sequências específicas do mRNA pode ser utilizada para a análise da função dos genes na maioria dos eucariontes assim como pode assistir no desenvolvimento de novos medicamentos. Em 2006 foi galardoado o prémio Nobel da medicina a Andrew Fire e a Craig Mello pela descoberta do *interference* RNA (Drozd *et al.*, 2002; Golden *et al.*, 2002, Kappel *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Mecanismo pelo qual pequenos RNA de interferência (siRNA- *small interference* RNA) e pequenas forcas de RNA participam no silenciamento dos genes. Activação do complexo que induz o silêncio do RNA (RISC- *RNA induced silencing complex*), originando emparelhamento completo com o mRNA e produzindo a inibição por degradação do transcrito-alvo (Adaptada de Cheng *et al.*, 2003).

## 2.9. Edição do RNA

A edição do RNA altera a sequência de um nucleótido de um transcrito, de forma que a sequência de RNA difere do “padrão” genómico do qual foi transcrito. Descoberta em 1986 por Benne e colaboradores, demonstrou-se que a edição do RNA ocorre no núcleo, nas mitocôndrias e nos cloroplastos (Benne *et al.*, 1996; Fuchs *et al.*, 2001).

A edição do RNA pode ser dividida em duas classes principais: uma inclui a edição por inserção/delecção e a outra por conversão. Neste último caso, a edição do RNA altera a identidade de um nucleótido numa posição específica mas não o número de nucleótidos (Fuchs *et al.*, 2001).

Embora se tenha descrito extensamente o fenómeno de edição do RNA em protozoários e em plantas, em mamíferos este processo é mais simples e menos descrito. O primeiro caso em que se descreveu a edição de RNA em mamíferos foi a criação de um novo codão de paragem, que resultou na formação de duas proteínas de tamanho diferente. O mecanismo pelo qual ocorre este processo não está ainda compreendido (Chen *et al.*, 1987; Lorkowski e Cullen, 2003).

## 3. Modificações das proteínas depois da tradução

As proteínas também podem ser modificadas depois da tradução por processos como a “*cleavage*” proteolítica das proteínas, a acetilação e a prenilação, mas também por glicosilação, fosforilação, metilação, sulfatação ou ubiquitinação. Algumas destas modificações não alteram a sequência das proteínas mas são muito importantes, uma vez que podem afectar a sua actividade, aumentando a plasticidade das células. Ainda que estas modificações sejam muito importantes para a adaptação das células eucariontes, não nos centraremos no seu estudo (Lorkowski e Cullen, 2003).

## **C. Métodos de análise da expressão do mRNA**

### **1. Introdução**

Desde a invenção da técnica de Northern blot há aproximadamente 30 anos que a análise da expressão de RNA evoluiu muito, permitindo através da utilização de várias metodologias a análise simultânea do padrão de expressão do RNA.

Existem actualmente vários métodos capazes de analisar a expressão do RNA que se podem classificar de “arquitectura fechada” e de “arquitectura aberta.” A utilização de métodos de “arquitectura fechada” como a técnica de microarrays permitem unicamente a análise de sequências conhecidas, enquanto que os métodos de “arquitectura aberta” como a técnica de DD possibilitam a análise de sequências não conhecidas (Lorkowski e Cullen, 2003).

Embora não classifique com exactidão todos os métodos de análise do RNA estes podem ser divididas em três grupos diferentes, sendo um dos grupos constituído por métodos que se baseiam na hibridação dos ácidos nucleicos (microarrays de DNA), outro grupo inclui os métodos que se baseiam na técnica de PCR (RT-PCR- Reacção de Transcriptase Reversa de Polimerase em Tempo Real) e o grupo dos que se baseiam na sequenciação (SAGE- Análises em Série da Expressão Genética) (Lorkowski e Cullen, 2003).

Existem actualmente muitas técnicas de análise da expressão do RNA. Cabe a cada investigador seleccionar a metodologia que melhor se adapte ao seu estudo tendo em conta a quantidade de material biológico inicial, a sensibilidade da técnica, a cobertura do método e o custo de utilização. Uma vez que existem muitas técnicas optamos por descrever as empregues neste estudo, assim como algumas das metodologias alternativas mais utilizadas.

### **2. Differential display**

A técnica de differential display (DD ou DDRT-PCR ou DD-PCR) foi criada em 1992 por Liang e Pardee, com o intuito de isolar e de caracterizar de forma rápida e simples genes ao nível do mRNA que se expressam de forma diferencial sem o prévio

conhecimento da sequência, de forma a permitir compreender como as células eucariontes regulam os genes em processos fisiológicos normais ou em patologias (Liang, 2002, 2006; Liang e Pardee, 1992, 1997, 2003; Liang *et al.*, 1992, 1993, 1995; 2007).

A estratégia geral do DD baseia-se na combinação de três técnicas simples, como a reacção da transcriptase reversa (RT) do mRNA com *primers*-“âncora”, a realização de uma reacção da cadeia de polimerase (PCR) utilizando *primers* com uma sequência arbitrária de forma a amplificar o cDNA, cada um correspondendo a partes do mRNA, e a realização de géis de sequenciação de forma a separar por tamanho os fragmentos de cDNA amplificados (figura 6) (Liang e Pardee, 1997).

A técnica de DD é capaz de comparar mais de duas amostras de RNA de cada vez (Matz e Lukyonov, 1998; Lievens *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2007). Uma das vantagens é a necessidade de pouca quantidade de RNA das amostras em estudo (10-200 µg de RNA total). No entanto, vários autores aconselham a utilização de amostras de RNA em duplicado ou mesmo em triplicado (Liang *et al.*, 1993; von der Kammer *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2000; Stein e Liang, 2006; Liang *et al.*, 2006). Para a realização de DD recomenda-se a extracção de RNA total, uma vez que a purificação de RNA poliadenilado é um processo mais moroso e que poderá deixar contaminações com *primers* oligo-dT capazes de causar dificuldades na realização da técnica DD. O RNA total celular pode ser purificado por diferentes métodos, como o que utiliza guanidina hidróclorido ou o da guanidina tiocianato, também conhecido como método de Chomczynski e Sacchi (1987) (Liang e Pardee, 1997; Zhao *et al.*, 1998; Bosch *et al.*, 2000; Sambrook e Russel, 2001; Liang *et al.*, 2007). No entanto, todos os métodos de extracção de RNA são incapazes de eliminar todos os vestígios de DNA das amostras de RNA. Para evitar que o DNA seja amplificado em conjunto com o mRNA, complicando o perfil das bandas obtidas em DD, é necessário a eliminação de todos os vestígios de DNA das amostras de RNA, ficando geralmente unicamente 50 a 80% da quantidade original de RNA total (Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2007). A forma mais frequente, sensível e bastante eficaz de eliminar o DNA das amostras de RNA é utilizar a enzima de DNase em condições específicas, assegurando desta forma que os produtos resultantes da RT sejam o resultado da amplificação do cDNA sintetizado durante a reacção de transcriptase reversa (Wiame *et*

*al.*, 2000).

Para quantificar a concentração das amostras de RNA costuma-se ler num espectrofotómetro a absorção a 260 nm e utilizam-se amostras em que a relação da absorção a 260 e a 280 nm esteja compreendida entre 1,7 e 2,0, assegurando que o RNA não esteja contaminado com proteínas ou com resíduos de guanidina ou de fenol, que podem inibir a RT. Para verificar a integridade de RNA é costume realizar-se uma electroforese em gel de agarose, de forma a permitir observar as bandas de rRNA de 18S e 28S (Colonna-Romano *et al.*, 1998; Sambrook e Russel, 2001; Liang *et al.*, 2007).

Com o RNA total não degradado e não contaminado realiza-se a síntese de cDNA com a utilização de três *primers* oligo-dH-T<sub>11</sub>M (M = A, C o G), designados por *primers*-“âncora” de uma só base. Característico destes *primers*-“âncora” é a existência de uma sequência (AAGCTT) designada por “H” capaz de ser reconhecida pela enzima de restrição HindIII. Esta sequência permite que estes *primers* sejam maiores, hibridem de forma mais eficiente com a cauda de A, podendo ainda ser utilizada na clonagem do cDNA. Segundo Liang *et al.*, (2007), o facto de estes *primers*-“âncora” apresentarem uma base M (M = A, C o G), distinta da T permite amplificar a mesma sequência em cada ronda de amplificação, em comparação com um *primers* oligo-dT que só contenha T que hibrida em distintas sequências criando nos géis um “arrastamento”. Embora no início desta técnica (Liang e Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1993) tenham sido utilizados, por razões históricas, *primers* - “âncora” de duas bases – *primers* oligo-dT<sub>11</sub>MA, dT<sub>11</sub>MC e dT<sub>11</sub>MG (M = A, C ou G) –, foi observado que os *primers*-“âncora” de uma só base, que se utilizam actualmente, apresentam várias vantagens sobre os anteriores, uma vez que diminuem a redundância dos *primers*, eliminando o lastro do fundo, para além de reduzir para cada amostra o número de reacções de transcriptase reversa de 12 para 3 (Liang *et al.*, 1994; Liang, 1998; Yang e Liang, 2006).

A selecção das enzimas transcriptases reversas é importante. A enzima Moloney murine virus (MMLV) apresenta resultados melhores do que a MMLV RNasa H<sup>-</sup>. A enzima Superscript apresenta resultados contraditórios. Enquanto um grupo de investigadores reportam que esta é superior à MMLV, outro grupo observou resultados opostos (Bosch *et al.*, 2000; Sturtevant, 2000).

Para evitar criar diferenças artificiais entre as amostras em estudo, vários autores

aconselham a realização de uma matriz com os componentes da RT que depois se divide pelas amostras em estudo (Liang *et al.*, 1993; Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998; von der Kammer *et al.*, 1999).

Na técnica de DD realiza-se a amplificação dos fragmentos de cDNA obtidos por RT com a técnica de PCR. Nesta utiliza-se um número limitado de *primers* arbitrários. O comprimento ideal dos *primers* arbitrários é determinado por considerações estatísticas, de forma a permitir que cada um reconheça 50 a 100 espécies de mRNA. Embora se haja determinado estatisticamente que para isso cada *primer* deverá hibridar como um *primer* de seis a oito bases, na prática os *primers* menores de nove bases não amplificam na PCR, provavelmente devido a que não existe uma superfície de contacto suficiente entre a enzima Taq polimerase e a cadeia dupla de DNA. No início utilizavam-se para DD *primers* arbitrários de dez bases em combinação com *primers*-“âncora” de duas bases. Embora esta combinação nas condições adequadas permitisse observar o número de bandas esperadas, foram obtidos sinais débeis e baixa reprodutibilidade. Por isso, o comprimento dos *primers* foi aumentado para 13 bases (*primers* H-AP). Estes são desenhados para conter a sequência (AAGCTT), capaz de ser reconhecida pela enzima de restrição HindIII e 7-bp com uma sequência arbitrária. Desta forma estes cumprem os requisitos necessários para se considerar, segundo alguns autores, *primers* arbitrários ótimos, uma vez que permitem amplificar 50 a 100 mRNA de algumas centenas de bp, suficientemente grandes para identificar unicamente um mRNA mas também suficientemente pequenas para se separarem por tamanho. Estes *primers* apresentam como vantagem, segundo alguns autores, a capacidade de originar uma baixa redundância (uma espécie de mRNA representa-se com uma só banda em cada linha do gel). Além disso, segundo os mesmos autores, estes *primers* arbitrários de 13 bases são capazes de hibridar de uma forma previsível, de maneira a que se pode desenhar um conjunto representativo que permita visualizar a maioria dos mRNA de uma célula de tal forma que, por exemplo, uma combinação dos três *primers*-“âncora” com oito *primers* arbitrários apresenta uma probabilidade de detectar 28% de uma dada fracção de mRNA\*. Embora um modelo

---

\* Probabilidade de detecção duma determinada fracção de mRNA  $P = 1 - (0,96)^n$ , sendo  $n$  o número de *primers* arbitrários

matemático estimasse ser necessária uma combinação de 240 *primers* para obter uma cobertura de 95% do genoma, actualmente calcula-se que será necessária uma combinação de 480 *primers* para obter uma cobertura de 93% do genoma (Liang *et al.*, 1994, 1995, 2007; Liang e Pardee, 1997; Liang, 1998; Colonna-Romano *et al.*, 1998; Yang e Liang, 2006).

Também foram utilizados em DD *primers* arbitrários de 20 bases ou, inclusivamente, maiores, para aumentar a reprodutibilidade do padrão de cDNA (Zhao *et al.*, 1995; Diachenko *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). A utilização de *primers* de 20 bases em combinação com dois procedimentos de PCR aumenta a reprodutibilidade e o comprimento dos produtos de DD. São incluídos sítios para as enzimas de restrição nos extremos 5' para facilitar a clonagem. Uma limitação da utilização de *primers* pequenos (13 bases) é que geralmente amplificam sequências na região 3' que não é traduzida, (EST- *expressed sequence tags*) pelo que muitas vezes não apresentam homologia com sequências reportadas nas bases de dados. A utilização de *primers* com maior comprimento aumenta o comprimento dos fragmentos amplificados, que podem mais facilmente demonstrar homologia com sequências antes classificadas (Sturtevant, 2000). No entanto, segundo alguns autores, *primers* compridos (20 bases ou mais), em condições degenerativas hibridam de forma não previsível, tornando difícil o desenho de um conjunto de *primers* representativo do mRNA. Também os mesmos autores apontam que *primers* mais compridos podem gerar um padrão complexo de cDNA nos géis de DD, de forma a que, embora possa parecer reproduzível, muitas das bandas são susceptíveis de representar o mesmo mRNA, não demonstrando frequentemente a complexidade da população de mRNA (Liang *et al.*, 1993; Liang, 1998; Sturtevant, 2000).

Também existe referência na bibliografia da utilização de *primers* especiais que permitem aplicar a técnica de DD a bactérias em que o mRNA não apresenta cauda de poli (A) (Fislage *et al.*, 1997; Walters e Rouvière, 2006). Igualmente, alguns laboratórios utilizam *primers* desenhados especialmente que permitem a aplicação desta técnica quando a quantidade de RNA é limitante (Zhao *et al.*, 1998; Sturtevant, 2000).

Embora frequentemente as bandas de cDNA nos géis de DD possam fazer-se visíveis com a incorporação de radioactivos (dNTP) na reacção de PCR, também se pode visualizar as bandas de cDNA por métodos não radioactivos. Existem diferentes

possibilidades, mas neste caso são frequentemente utilizados marcadores fluorescentes (JOE, FAM, ROX, TAMRA, HEX) ou marcadores químio-luminescentes (digoxigenina ou biotina) nos *primers*-“âncora” (H-T<sub>11</sub>G, H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>C) que se incorporam na reacção de PCR (Ito *et al.*, 1994; George *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Motlik *et al.*, 1998; Yoshikawa *et al.*, 1998; To, 2000; Cho *et al.*, 2001; Stein e Liang, 2002b; Yang e Liang, 2004; Cho *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Meade *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2007). Este tipo de differential display fluorescente (FDD), combinando a robótica com a análise de dados digitais, permite a automatização desta metodologia e consequentemente uma elevada capacidade de processamento para além de uma elevada precisão e sensibilidade (Lorkowski e Cullen, 2003; Cho *et al.*, 2006; Meade *et al.*, 2006; Liang, 2006; Liang *et al.*, 2007). No entanto, a realização do FDD requer *scanners* especiais, capazes de ler a fluorescência, e programas de computador para ajudar a analisar os resultados. Não é possível a realização do FDD em sequenciadores automáticos que não permitam a recuperação dos fragmentos de cDNA dos géis, uma vez que em muitos sequenciadores automáticos os fragmentos de cDNA se perdem no tampão depois de realizar a leitura da fluorescência. No ano de 2007 é muito aconselhado para a realização de FDD a utilização de um sequenciador automático horizontal capaz de realizar a electroforese simultânea de 132 amostras (Reinhardt *et al.*, 1999; Lorkowski e Cullen, 2003; Liang, 2006; Liang *et al.*, 2007).

Como antes se referiu, é frequente a utilização de auto-radiografias para visualizar os fragmentos de cDNA marcados com radioactivos, o que origina que os géis tenham de ser secos. A incorporação de radioactivos nas reacções de PCR é frequentemente conseguida pela utilização de dNTPs “quentes” como o  $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]-dATP ou o  $\alpha$ -[<sup>35</sup>S]-dATP. Uma vez que foi observado que o  $\alpha$ -[<sup>35</sup>S]-dATP se pode vaporizar e contaminar o termociclador, recomenda-se a utilização de  $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]-dATP na realização de DD (Liang, 1998; Colonna-Romano *et al.*, 1998; Sturtevant, 2000; Liang *et al.*, 2007). Nas reacções de PCR em que se utiliza um dNTP marcado com radioactivo, pode utilizar-se uma concentração de dNTP inferior à que se considera “óptima” para a realização destas reacções. Este procedimento visa conseguir a total incorporação do dNTP marcado com radioactivo no fragmento amplificado (Liang e Pardee, 1992; Cho *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2007). Por isso, quando se realiza a PCR da técnica de DD



sem a incorporação de dNTP marcados com radioactivos, como é o caso de FDD, costuma utilizar-se uma maior concentração de dNTP (Ito e Sakaki, 1997; Cho *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2007).

Nas reacções de PCR, tal como nas de RT, aconselha-se a realização de uma matriz com os componentes da PCR que depois se dividem pelas amostras em estudo. Considera-se muito importante a realização da PCR em tubos de parede fina, uma vez que pode afectar a reprodutibilidade e a intensidade das bandas (Liang *et al.*, 1993; Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998; von der Kammer *et al.*, 1999).

Foi observado que na reacção de PCR a enzima Taq polimerase apresenta melhores resultados que a Stoffel (Rosok *et al.*, 1996; Sturtevant, 2000). A concentração dos outros componentes da PCR (Taq polimerase, MgCl<sub>2</sub>), assim como as condições de temperatura, tempos de alargamento e número de ciclos da PCR são optimizadas para que se obtenha bandas de cDNA intensas e que se maximize a reprodutibilidade (Ito e Sakaki, 1997; Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998, Sturtevant, 2000). A separação por tamanho dos fragmentos de cDNA amplificado realiza-se frequentemente em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes, de forma a poder visualizar 50 a 100 fragmentos amplificados de cDNA (Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2007). Também existem autores que, para contornar os inconvenientes da utilização de radioactivos, sugerem a utilização de géis de agarose tingidos com brometo de etídio (Sokolov e Prockop, 1994; Rompf e Kahl, 1997; Brown *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2000; Pienta e Schwab, 2000; Yamauchi *et al.*, 2005), ou géis de poliacrilamida geralmente em condições não desnaturantes tingidos com nitrato de prata (Lohmann *et al.*, 1995; Doss, 1996; Bosch e Lohmann, 1996; Kociok *et al.*, 1998; Bockelmann *et al.*, 1999; Dorroch *et al.*, 2001; Ponsuksili *et al.*, 2001; Bochu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). A substituição da incorporação de radioactivos nos géis por coloração com brometo de etídio ou com nitrato de prata permite a visualização directa das bandas. Mas nenhuma destas alterações parece apresentar maior resolução ou sensibilidade do que os géis de poliacrilamida desnaturante (Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998; Sturtevant, 2000; Liang *et al.*, 2007).

Depois da análise dos géis utilizando programas de computador específicos ou com a simples visualização directa do investigador a fim de se determinar as bandas

candidatas para a expressão diferencial entre as amostras em estudo, estas são cortadas dos géis. A obtenção das bandas candidatas marcadas com radioactivos requer especial atenção, já que os fragmentos de cDNA são visíveis em películas de auto-radiografia mas não se podem observar directamente nos géis de poliacrilamida. É muito importante que o gel e a película radiográfica estejam correctamente alinhados, porque disso depende a obtenção da banda candidata que se corta do gel de DD. Embora não apresente uma fiabilidade de 100% é mais frequente a marcação dos géis e das películas com punções de agulha ou com radioactivos (Kim *et al.*, 1995; Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998). Depois de cortar as bandas candidatas dos géis para a expressão diferencial, o cDNA têm de ser precipitado para eliminar os restos de gel e de papel que possa conter. O cDNA da banda candidata é então reamplificado, realizando uma segunda PCR com as mesmas condições da PCR antes descrita, com a excepção de que não se utilizam dNTP marcados com radioactivos, sendo portanto necessário utilizar uma maior concentração de dNTP, pelas razões antes apresentadas (Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2007).

Depois de obter as bandas candidatas reamplificadas, pode-se confirmar directamente a expressão diferencial do fragmento de cDNA entre as amostras em estudo, realizando a técnica de Northern blot (a mais frequentemente utilizada), mas também se pode realizar outras técnicas para confirmar a expressão diferencial, como “reverse Northern”, dot blot ou a técnica de “*real-time reverse transcription polymerase chain reaction*” (RT-PCR), entre outras (Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998; Stein e Liang, 2002a ; Liang *et al.*, 2007). De seguida, realiza-se a clonagem das bandas que confirmaram a expressão diferencial, com o objectivo de obter uma cópia ilimitada das bandas de interesse. Depois da sequenciação das bandas de cDNA que se expressam de forma diferencial pode-se comparar os resultados obtidos com uma base pública de dados como o BLAST e saber mais informação sobre os resultados (Wang *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997; Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998; Stein e Liang, 2002a).

Alternativamente à opção anteriormente referida, em que se confirma a expressão diferencial, clona-se unicamente as bandas de interesse, sequencia-se e compara-se os resultados com uma base pública de dados, pode clonar-se todas as bandas candidatas, sequenciá-las e comparar os resultados com uma base pública de

dados e no final confirmar a expressão diferencial com uma das técnicas antes descritas (Wang *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997; Liang e Pardee, 1997; Colonna-Romano *et al.*, 1998; Stein e Liang, 2002a). As duas alternativas apresentam vantagens e desvantagens. Na primeira opção unicamente se segue o estudo das bandas em que se confirmou a expressão diferencial, evitando clonar e sequenciar as bandas que não interessam (falsas positivas), mas não existe o prévio conhecimento da sequência da banda candidata e o número de cópias das bandas antes da clonagem pode ser limitante. A segunda alternativa apresenta como vantagem as desvantagens que apresenta a opção anterior, e vice-versa com as desvantagens. Embora Liang *et al.*, (2007) afirmem que a decisão depende do investigador e da situação recomendam a segunda opção.

Um dos principais inconvenientes da metodologia de differential display são os falsos positivos, que são as bandas candidatas que nos géis de DD parece que se expressam de forma diferencial mas que não se consegue comprovar a sua expressão diferencial com outras técnicas. Uma pergunta frequentemente colocada é qual é a taxa de falsos positivos. Infelizmente, não é possível responder com exactidão a esta pergunta, porque está dependente de muitos factores, influenciando a diferença que existe entre as amostras que se analisam (Liang, 1998; Cho *et al.*, 2002). Factores intrínsecos e extrínsecos a DD parecem afectar a taxa de falsos positivos. Os factores intrínsecos, mais frequentemente referidos como causadores de bandas falsas positivas são a utilização de *primers*-“âncora” de duas bases e o comprimento dos *primers* arbitrários, mas também existem autores que referem a temperatura de hibridação das PCR como causadora dos falsos positivos (Liang, 1998; Cho *et al.*, 2002). Como factores extrínsecos causadores de falsos positivos foram referidas as diferenças artificiais criadas por procedimentos de extracção de RNA não standardizados, a utilização de RNA degradado ou a contaminação das amostras de RNA com DNA de cromossoma. Nas RT ou nas PCR, termocicladores que não distribuem uniformemente a temperatura, erros na pipetagem dos componentes das reacções, falta de qualidade dos reagentes e enzimas constituem, outrossim, factores extrínsecos causadores de falsos positivos. O mesmo pode suceder nas reacções de PCR quando são utilizados tubos com parede não uniforme ou demasiadamente grossa. Também vários autores referem como causa frequente de falsos positivos o facto de as bandas candidatas recuperadas dos géis de DD poderem estar compostas de mais de uma banda de cDNA, devido a erros no

alinhamento do gel com a película auto-radiográfica ou devido a que fragmentos de tamanho idêntico co-migrem com a banda de interesse (factor intrínseco). São inúmeras as publicações que tratam deste tema e que apresentam soluções para tentar minimizar o número de falsos positivos e que procuram reduzir os inconvenientes de utilização desta técnica (Vogeli-Lange *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Sung e Denman, 1997; Liang, 1998; Luce e Burrows, 1998; Matz e Lukyanov, 1998; Malhotra *et al.*, 1998; Miele *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2007).

Outros métodos foram derivados de differential display. Entre estas técnicas inclui-se os “*RNA Fingerprinting por Primers Arbitrários de PCR*” (RAP-PCR). O RAP-PCR é muito semelhante ao DD, com excepção de que a reacção de RT é realizada com *primers* arbitrários em vez do *primer* oligo(dT). A etapa de amplificação por PCR pode-se realizar com os mesmos ou com outros oligonucleótidos arbitrários (McClelland *et al.*, 1995; Mathieu-Daude *et al.*, 1999; Sturtevant, 2000).

O DD com *primers* selectivos (SPR) surgiu como uma modificação à técnica original para aumentar a identificação do mRNA moderado ou pouco abundante. A SPR difere do RAP-PCR e do DD porque os *primers* arbitrários são escolhidos experimentalmente de forma a evitar a amplificação de transcritos muito abundantes (Ikononov e Jacob, 1996; Sturtevant, 2000).

Outra adaptação do DD é o *Target Display*. Esta modificação permite a identificação e o isolamento de membros de uma família de genes, genes com especiais domínios que se expressam em diferentes condições. A RT realiza-se com *primers*-“âncora” e a PCR realiza-se com *primers* degenerados, homólogos aos domínios conservados das proteínas (Fisher *et al.*, 1995; Sturtevant, 2000).

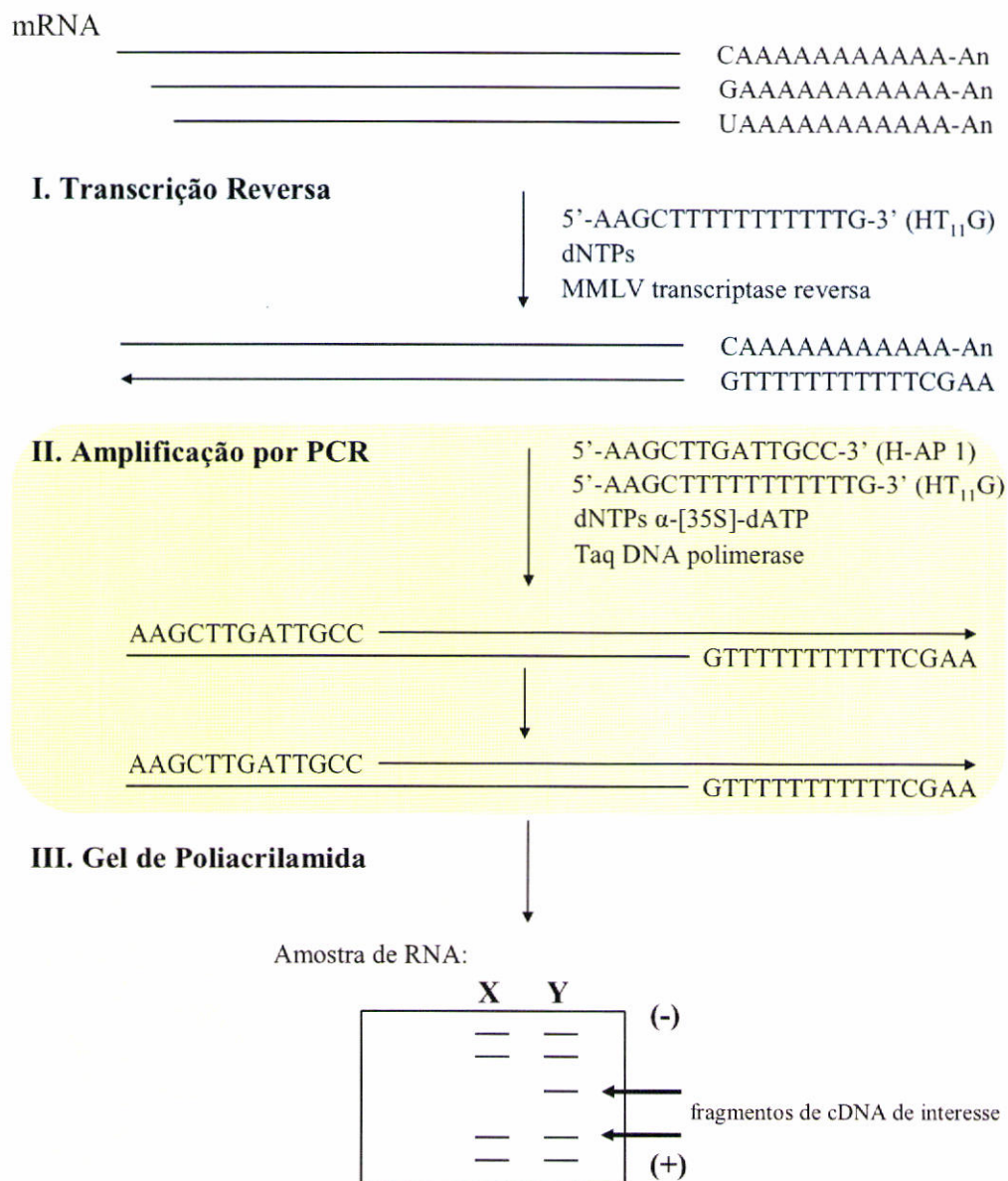
A técnica “*Ordered differential display*” (ODD) é também resultante de alterações da técnica de DD. De uma forma sucinta, na técnica de ODD o cDNA é sintetizado com *primers* oligo(dT) de 20 bases cujo extremo 3’ termina numa estrutura designada por “heel”. O cDNA é seguidamente digerido por enzimas de restrição e ligado a adaptadores. Realiza-se então uma PCR utilizando os mesmos *primers* da reacção de síntese de cDNA e um *primer* correspondente à parte distal do adaptador acrescido de duas bases. Desta forma, pretende-se obter amostras amplificadas que contêm unicamente o extremo 3’ do fragmento de cDNA resultante da reacção de restrição. Depois de várias reacções de PCR que combinam *primers* oligo(dT) e

diferentes *primers* correspondentes à parte distal do adaptador, a expressão diferencial da expressão de genes poderá ser visualizada em géis de poliacrilamida. Esta técnica embora apresente algumas vantagens como a necessidade de uma menor quantidade de RNA inicial é laboriosa e não existem kits comerciais disponíveis (Sturtevant, 2000; Lorkowski e Cullen, 2003).

A técnica de differential display tem sido aplicada em diferentes áreas. Foi aplicada no estudo da glândula mamária de rata durante o período de desmame (Burke *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2006). Também se aplicou na identificação de sequências de DNA associadas a mastite na glândula mamária de vacas (Schwerin *et al.*, 2003). Na saúde humana, no estudo do cancro dos ovários (Li *et al.*, 2005) e do *oncogenes ras* (Jo *et al.*, 2001). Também se aplicou DD em imunologia (Ali *et al.*, 2001), na análise dos genes implicados na cicatrização das feridas (Darden *et al.*, 2000; Soo *et al.*, 2002), na caracterização de um gene novo que inibe o crescimento da glândula mamária durante a gestação (Huynh *et al.*, 2001), na identificação de genes nos intestinos que são influenciados pela alimentação (Blanchard e Cousins, 2000), na identificação de genes que regulam os androgénios (Greenland *et al.*, 2004), ou na caracterização de genes implicados na diferenciação dos eritrócitos (Yu *et al.*, 2004), no estudo da hepatite B (Kim, 2006), na investigação do gene regulador p53 (Liang e Pardee, 2003; Stein *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2006), no estudo da depressão melancólica (Liang *et al.*, 2006), mas também na identificação de marcadores de doenças causadas por priões (Clinton *et al.*, 2006), na identificação de genes implicados na regeneração celular do fígado (Fujino *et al.*, 2006), entre muitas outras aplicações.

Também se aplicou differential display no estudo dos macrófagos de bovinos quando infectados com *Mycobacterium paratuberculosis* (Tooker e Coussens, 2004) e na análise da expressão de genes no fígado de bovinos (Schrader *et al.*, 2003). Realizou-se um exame da expressão comparativa dos transcritos dos genes nos estados de desenvolvimento de embriões de bovinos produzidos *in vivo* ou *in vitro* com esta técnica (Tsfaye *et al.*, 2003; Tsfaye *et al.*, 2004). Foi utilizado o DD para estudar a influência de uma protease lisossomal na fase de desmame da glândula mamária de ratas que ocorre depois da lactação (Burke *et al.*, 2003), para analisar alterações durante o desenvolvimento do transcrito fetal de porcos (Wesolowski *et al.*, 2004) e para identificar genes que se expressam no músculo *longissimus* de porcos com elevada taxa

de crescimento (Janzen *et al.*, 2000). Igualmente foram estudados com esta técnica os genes que se expressam no porco durante a infecção com determinados vírus (Bratanich e Blanchetot, 2006). O DD aplicou-se no estudo da expressão genética de diferentes animais como em galinhas (Zhu *et al.*, 2001), em abelhas (Hepperle e Hartfekder, 2001; Santana *et al.*, 2006) ou em peixes (Dakis e Kouretas, 2002). Em ovelhas utilizou-se esta técnica na análise da expressão de um determinado gene no epitélio do endométrio de ovelha (Ing *et al.*, 2006), entre outros estudos.



**Figura 6.** Representação esquemática da técnica de differential display. Depois do isolamento de RNA total das amostras em estudo, realiza-se uma reação de transcriptase reversa com a utilização de um dos três *primers*-“âncora” de uma base (oligo-dT<sub>11</sub>A, oligo-dT<sub>11</sub>C e oligo-dT<sub>11</sub>G). Na amplificação por PCR utilizam-se *primers* de sequência arbitrários de 13 bases (H-AP), na presença de dNTP marcados com α-[<sup>35</sup>S]-dATP. Depois da amplificação, os produtos são separados por electroforese em gel de poliacrilamida. As setas indicam os fragmentos de cDNA que se expressam de forma diferencial nas amostras em estudo (Liang e Pardee, 1997).

### 3. Northern blot (Transferência de RNA)

A técnica de Northern blot, ou de transferência de RNA, surgiu a partir de uma modificação da técnica criada por Edward Southern em 1975, de tal forma que permite a detecção de sequências específicas nas preparações de RNA. Desde a sua criação em 1977, Northern blot é a técnica mais utilizada para analisar a expressão de mRNA (figura 7) (Lorkowski e Cullen, 2003).

Na técnica de Northern blot, depois da obtenção do RNA intacto realiza-se uma electroforese sob condições desnaturantes, de forma a não permitir que o RNA de cadeia simples forme estruturas secundárias. Quando se coloca o gel num tampão adequado e se o sujeita a um campo eléctrico, as diferentes espécies de RNA separaram-se quando se movem no campo eléctrico desde o pólo negativo ao positivo. Com a separação das moléculas de RNA por tamanho, as moléculas maiores de RNA migram mais devagar do que as moléculas pequenas (Lorkowski e Cullen, 2003).

Embora seja possível realizar géis de agarose desnaturante com glioxal ou com formaldeído, os segundos são mais frequentemente utilizados. A maior popularidade dos géis de agarose que contêm formaldeído deve-se a que este desnaturante se dissocia mais facilmente do RNA depois da electroforese. No entanto, os géis de agarose que contêm formaldeído são mais finos, menos elásticos e mais frágeis, exigindo, portanto, maior cuidado no manuseamento (Sambrook e Russell, 2001).

As amostras de RNA separadas em géis de agarose que contêm formaldeído poderão ser desnaturadas por tratamento com formamida. O formaldeído actua originando bases Schiff instáveis com o grupo amina dos resíduos de guanina e ao impedir o emparelhamento Watson-Crick permite manter o RNA no estado desnaturado unicamente quando o formaldeído está presente no tampão ou no gel (Sambrook e Russell, 2001).

Com o objectivo de poder visualizar as amostras de RNA depois da electroforese, alguns investigadores incluem brometo de etídio nos géis de formaldeído, uma vez que está provado que a utilização de brometo de etídio não compromete a transferência do RNA dos géis de formaldeído para as membranas e/ou não suprime a hibridação (Sambrook e Russell, 2001). Outros investigadores preferem, antes de



carregar as amostras nos géis, marcá-las directamente com brometo de etídio, uma vez que, se a concentração deste não for muito elevada, a eficiência da transferência e da hibridação do RNA não é afectada significativamente (Sambrook e Russell, 2001).

A transferência Northern consiste na passagem de RNA de um gel de agarose para um suporte sólido bi-dimensional pela acção capilar de um tampão de transferência ou por vácuo. Para realizar esta transferência existem vários solventes, diversos tipos de membranas (nitrocelulosa e nylon) e mais de uma opção para fixar à membrana o RNA transferido (Sambrook e Russell, 2001; Lorkowski e Cullen, 2003).

De maneira geral, os melhores resultados na detecção dos ácidos nucleicos são obtidos depois da transferência do RNA dos géis para membranas de nylon. Estas apresentam muitas vantagens sobre as membranas de nitrocelulose, pois são mais duráveis e têm maior capacidade de união dos ácidos nucleicos, conseguindo-se uma melhor transferência dos fragmentos pequenos e obtendo-se uma fixação irreversível do RNA. No mercado pode-se encontrar membranas de nylon neutras ou carregadas positivamente (Nylon<sup>+</sup>) (Sambrook e Russell, 2001).

As membranas de nylon carregadas retêm os ácidos nucleicos em soluções alcalinas, permitindo que o RNA seja transferido com eficiência desde os géis de agarose. A utilização destas membranas aumenta a velocidade e a eficiência da transferência de RNAs de grande tamanho (maior de 2,3 kb) (Sambrook e Russell, 2001).

No entanto, a transferência alcalina apresenta alguns inconvenientes: por vezes origina um elevado ruído de fundo na hibridação, especialmente quando são utilizadas sondas de RNA. Uma exposição maior (mais de 6 horas) das membranas de nylon carregadas aumenta esse problema. No entanto, em alguns casos pode-se minimizar estes efeitos secundários, diminuindo o tempo de transferência e utilizando cada vez maiores quantidades de agentes bloqueadores nos passos de hibridação e de pré-hibridação. Além disso, devido a variações entre os laboratórios que produzem as membranas de nylon podem-se verificar diferenças na intensidade do sinal de hibridação (Sambrook e Russell, 2001).

De uma maneira geral, realiza-se a transferência do RNA para as membranas não carregadas a pH neutro, com 10x ou com 20x SSC. O RNA híbrida à membrana pelos métodos tradicionais de colocar no forno sobe vácuo durante duas horas, por

aquecer em microondas 2 a 3 minutos, ou por exposição da membrana de nylon a radiação UV a 254/312 nm (*crosslink*). O RNA imobilizado nas membranas de nylon por radiação UV gera na hibridação Northern um sinal mais intenso do que o RNA imobilizado pelo método do forno (Sambrook e Russell, 2001; Lorkowski e Cullen, 2003).

Existem dois métodos de transferência capilar do RNA para as membranas de nylon (ascendente e descendente). No primeiro, a transferência dos ácidos nucleicos do gel de agarose para um suporte sólido consegue-se por “aspiração” do tampão de transferência no sentido ascendente desde um reservatório atravessando o gel até uma pilha de papéis. Os ácidos nucleicos fluem do gel pela corrente do tampão no sentido ascendente e depositam-se no filtro de nitrocelulose ou na membrana de nylon. Um peso aplicado em cima da torre de papel assegura uma forte conexão entre as camadas do material utilizado na transferência (Sambrook e Russell, 2001).

A transferência capilar descendente dos ácidos nucleicos do gel de agarose para um suporte sólido consegue-se fazendo passar o tampão de transferência desde o recipiente através do gel para a pilha de papéis. Os ácidos nucleicos fluem do gel pela corrente do tampão no sentido descendente e depositam-se no filtro de nitrocelulose ou numa membrana de nylon (Sambrook e Russell, 2001).

As amostras de RNA que foram transferidas e se fixaram à membrana podem hibridar com uma sonda específica para localizar a espécie de RNA de interesse. As sondas mais frequentemente utilizadas são fragmentos de cDNA de cadeia dupla. Embora existam diferentes formas de marcar uma sonda, o método mais frequentemente empregue utiliza hexómeros aleatórios da seguinte forma: depois de desnaturalizar o DNA adicionam-se os hexómeros aleatórios, permitindo-se um emparelhamento das bases. A enzima DNA polimerase é adicionada com dATP, dGTP, dTTP e o  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP marcado com radioatividade. A mistura é de novo desnaturalizada para separar as cadeias de DNA e está preparada para a hibridação (Lorkowski e Cullen, 2003).

Desenvolveram-se várias alternativas para evitar a utilização de radioatividade para a marcação dos ácidos nucleicos. Técnicas de marcação não radioativa utilizam o método antes mencionado para incorporar (ribo)nucleótidos modificados com um grupo digoxigenina ou biotina. Utilizando este último tipo de etiquetagem, é possível detectar a sonda hibridada empregando para isso anticorpos específicos para a digoxigenina ou

moléculas estreptavidina que se conjugam com uma enzima como a fosfatase alcalina. Esta conjugação com a enzima permite uma detecção não radioactiva, utilizando, por exemplo, substratos quimioluminescentes que emitem luz depois da desfosforilação enzimática (Lorkowski e Cullen, 2003).

A sonda é normalmente adicionada à membrana depois de esta ser tratada com agentes bloqueadores que eliminam a absorção não específica da sonda. Depois de deixar a sonda a incubar durante várias horas, para permitir a hibridação da sonda com o seu RNA-alvo imobilizado na membrana, realizam-se lavagens que permitem remover a sonda adventícia (Sambrook e Russell, 2001; Lorkowski e Cullen, 2003).

A membrana é manipulada para obter uma imagem da distribuição da sonda que se liga fortemente ao RNA de interesse. Existem dois sistemas para obter uma leitura da membrana depois da hibridação com uma sonda marcada com radioactivos. Um dos sistemas utiliza um aparelho de escanear depois de expor a membrana a uma painel de fósforo num período mínimo de duas horas. Este método permite obter, em relativamente pouco tempo (2-6 horas), imagens escaneadas com *laser* e guardadas como um arquivo de imagem num computador. Os sinais nestas imagens podem ser quantificados por densitometria. O segundo método consiste na obtenção de uma autoradiografia com um painel intensificador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Este método é simples e barato, embora demore mais (Sambrook e Russell, 2001; Lorkowski e Cullen, 2003).

Quando se utiliza uma sonda marcada com anticorpos ou enzimas, a detecção realiza-se introduzindo a membrana numa solução de cromogénio ou com substratos quimioluminescentes, de forma a produzir uma coloração ou a emitir luz nas regiões de hibridação (Lorkowski e Cullen, 2003).

Depois da análise dos resultados de hibridação, a sonda pode ser retirada da membrana (*stripping*), e esta poderá ser de novo utilizada noutra hibridação (Sambrook e Russell, 2001).

A técnica de Northern blot pode ser utilizada para analisar a expressão do mRNA de forma semiquantitativa, sendo para isso necessário realizar uma análise de densitometria do sinal obtido e a normalização da quantidade de amostra do material biológico. Para a normalização utiliza-se habitualmente uma sonda de um gene “*housekeeping*”, que funciona como estandar interno, permitindo realizar a quantificação relativa da expressão dos outros genes (Lorkowski e Cullen, 2003).

Para a normalização seria ideal um estandar interno que se expressasse em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estados de desenvolvimento, e que não fosse afectado pelos tratamentos experimentais. Os genes “*housekeeping*” definem-se por ter elementos promotores de genes específicos que determinam que se expressem em todas as células, mas tal não significa que a sua expressão não seja regulada. Na prática, os genes “*housekeeping*” utilizados, muitas vezes, como controlo interno para a normalização não se manifestam com níveis de expressão estáveis nas condições experimentais (Bustin, 2000; Schmittgene e Zakrajsek, 2000; Glare *et al.*, 2002; Bionaz e Loor, 2007).

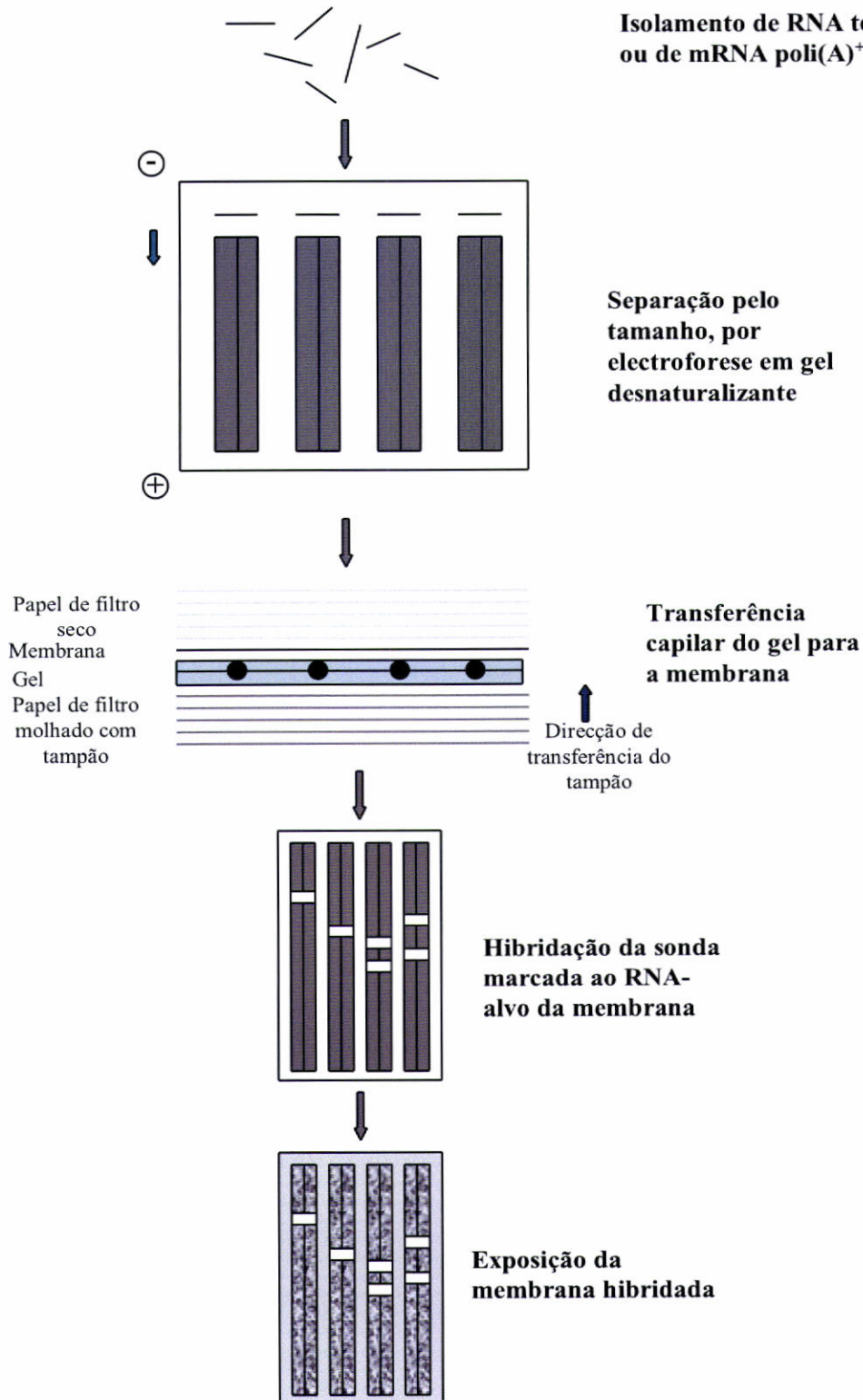
Os genes “*housekeeping*” mais frequentemente utilizados para a normalização são o glicerolaldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), a  $\beta$ -actina e os RNA ribossomais (rRNA), embora se possa ocasionalmente utilizar outros (Bustin, 2000; Bustin, 2002; Tricarico *et al.*, 2002; Bas *et al.*, 2004; Bionaz e Loor, 2007).

A técnica de Northern blot é frequentemente utilizada para analisar a expressão de mRNA em estudos da saúde humana (Gupta *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006) e em bovinos (Uzbekova *et al.*, 2006), mas também em ovelhas (Cassy *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2006; Skretting *et al.*, 2006). Lemkin *et al.* (2000) utilizaram Northern blot para a confirmação dos resultados obtidos com a técnica de microarrays realizados com o intuito de obter genes com expressão diferencial na glândula mamária de rato durante as fases de gestação e de lactação. Igualmente Burke *et al.* (2003) empregaram a metodologia de Northern blot para confirmar a maior expressão de um gene na glândula mamária de ratas durante o período de desmame detectado por differential display.

Embora a metodologia de Northern blot seja a técnica mais utilizada para confirmar a expressão diferencial das bandas de cDNA isoladas de géis de differential display, a falta de hibridação no Northern blot não significa necessariamente que o cDNA não se expresse de forma diferencial. A ausência de sinal no Northern blot poderá dever-se ao pequeno tamanho do fragmento clonado (menor do que 300 bp) ou à baixa expressão desse gene (Colonna-Romano *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2007).

Também existem autores que referem que a técnica de Northern blot é relativamente pouco sensível e que os múltiplos passos necessários à sua realização introduzem variações entre amostras (Bustin, 2000; Glare *et al.*, 2002). No entanto, Liang *et al.* (2007) afirmam o contrário, apesar da técnica de Northern blot apresentar

alguns inconvenientes pelo facto de ser trabalhosa e demorada é contudo o método mais simples uma vez que não necessita da manipulação da sequência de RNA, sendo por isso o método recomendado para confirmar a expressão diferencial quando utilizada em associação com a técnica de differential display.



**Figura 7.** Ilustração esquemática dos princípios de Northern blot. O primeiro passo consiste no isolamento do RNA total ou do mRNA poli (A) das células ou dos tecidos de interesse. As amostras de RNA são separadas por tamanho, utilizando géis desnaturantes. Depois da electroforese, transferem-se as amostras do gel para a

membrana, que neste caso se representa por transferência capilar. A membrana é hibridada com uma sonda de DNA ou de RNA marcada, complementar do RNA de interesse. Depois da lavagem, detecta-se o RNA de interesse utilizando autoradiografias ou quimioluminescência (Lorkowski e Cullen, 2003).

#### **4. Hibridação subtractiva ou competitiva**

A técnica de hibridação subtractiva foi proposta por Britten e Kohne em 1968, como método para identificar a presença de famílias de sequências repetitivas e da intercalação de sequências repetitivas e não repetitivas entre dois genomas. Com esta técnica a identificação de genes não está dependente do seu prévio conhecimento, sendo apta para a identificação de novos genes, muitas vezes pouco frequentes. Na hibridação subtractiva, a amostra do genoma de interesse, denominado por “tester” ou “tracer”, hibrida com a quantidade em excesso de um genoma-controlo, designado por “driver”, no qual a sequência alvo está ausente (Britten e Kohne, 1968; Gray e Collins, 2000; Byers *et al.*, 2000; Pastorian *et al.*, 2000; Pathak e Kanungo, 2007).

Este método é simples mas eficaz. No primeiro passo, as populações do tester e do driver preparadas a partir das amostras de interesse misturam-se, são desnaturalizadas e permite-se que se re-associem para formar moléculas híbridas de cadeia dupla. Durante a hibridação formam-se três populações: i) os homohíbridos de tester/tester, nos quais a cadeia dupla de ácidos nucleicos deriva da população tester; ii) os heterohíbridos driver/tester, nos quais cada cadeia de ácidos nucleicos é derivada da população do driver e do tester; e iii) os homohíbridos de driver/driver, nas quais a cadeia dupla de ácidos nucleicos deriva da população driver. Para uma molécula de ácido nucleico presente em quantidade igual nas amostras do driver e do tester, espera-se que a distribuição dos híbridos de cadeia dupla nessas três populações sejam respectivamente 25%, 50% e 25%. Cabe assinalar que esta distribuição é diferente quando existe maior abundância na população tester do que na população driver, observando-se no final uma maior quantidade de homohíbridos de tester/tester (figura 8) (Zhong *et al.*, 2000; Lorkowski e Cullen, 2003; Pathak e Kanungo, 2007).

A técnica de hibridação subtractiva genómica foi modificada de tal forma que se pode aplicar à análise da expressão de mRNA. Foi utilizada pela primeira vez em



1987, de forma a poder isolar os genes que se expressam mais num tipo de tecido ou de células, comparativamente com outros (Brown *et al.*, 1997). Embora se tenham realizado algumas modificações ao protocolo original de hibridação subtractiva, como o “*Chemical Cross Linking Subtraction*” (CCLS) ou o “*Directed Random Oligonucleotide Priming*” (DROP), parecem-nos mais interessante as que se realizam em combinação com a técnica de differential display (DD), como é o caso do “*Differential Subtraction Display*” (DSD) e o “*Subtracted differential display*” (SDD) (Bertioli *et al.*, 1995; Pardinas *et al.*, 1998).

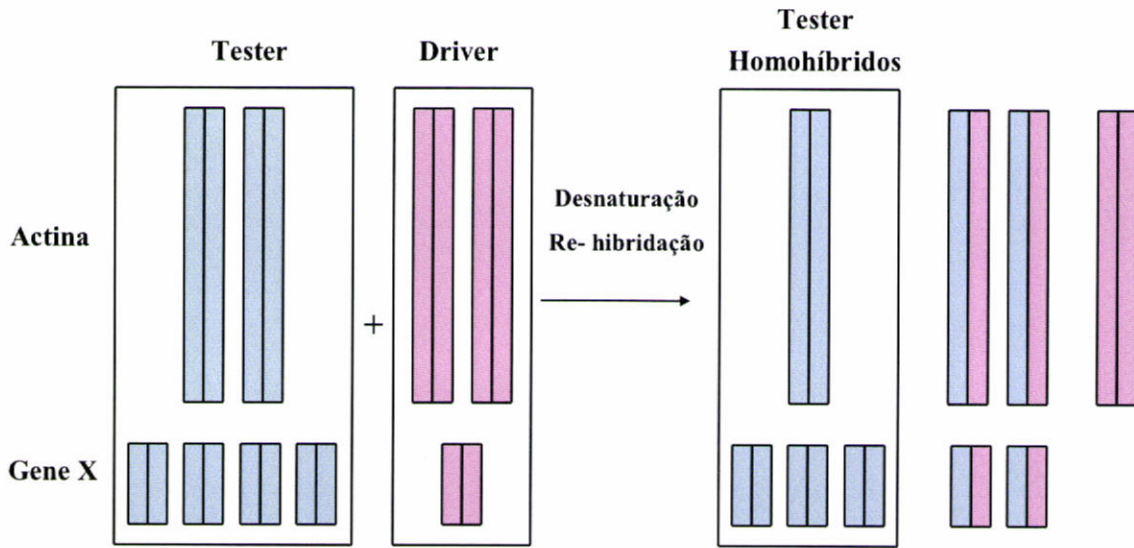
A técnica de DSD baseia-se na realização dos procedimentos DD, até à obtenção das bandas candidatas. Os autores de DSD propõem a realização da técnica de hibridação subtractiva com as bandas candidatas obtidas a partir dos géis de DD, antes da realização da clonagem destas bandas. Espera-se assim reduzir ou mesmo evitar os falsos positivos, assegurando a reamplificação das espécies de cDNA que se apresentam unicamente numa das amostras ou que apresentam expressão variável entre as duas amostras de RNA em análise (Pardinas *et al.*, 1998).

Por seu lado, a técnica de SDD propõe a realização da hibridação subtractiva antes da realização de DD. Pretende-se desta forma aumentar a detecção dos mRNA menos abundantes, uma vez que a técnica de DD tende a apresentar um determinado desvio para os mRNA mais abundantes. Na hibridação subtractiva, a população de RNA comparada utiliza-se directamente, sem prévia realização de reacção de transcriptase reversa, sendo depois realizada a DD, com a vantagem de surgirem menos bandas nos géis, reduzindo os falsos positivos (Bertioli *et al.*, 1995; Pathak e Kanungo, 2007).

Embora muitas vezes com modificações, a técnica de hibridação subtractiva foi utilizada para estudar o cancro (Chen *et al.*, 2006; Maass *et al.*, 2002), mas também em estudos da saúde humana (Yoshimi *et al.*, 2005; Byers *et al.*, 2000). Igualmente se podem encontrar estudos em ovelhas (Spencer *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999) e em bovinos (Pennetier *et al.*, 2005; Potts *et al.*, 2003).

Como inconvenientes para a utilização desta técnica aponta-se o facto de necessitar de grandes quantidades de mRNA, de ser trabalhosa, de ser pouco sensível e de não poder dar informação sobre um genoma inteiro (Odeberg *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000; Stein e Liang, 2002; Pathak e Kanungo, 2007).





**Figura 8.** Princípios da hibridação competitiva. Em duas populações de cDNA de cadeia dupla, o tester (azul) e o driver (rosa), o cDNA que codifica actina expressa-se de forma igual, enquanto o cDNA que expressa o gene X de interesse encontra-se mais frequentemente na população tester do que na do driver. Depois de misturar as duas populações, de se desnaturar e de se permitir que re-hibridam, surgem três classes de moléculas: os homohíbridos de tester/tester (duas cadeias azuis), os heterohíbridos driver/tester (uma cadeia azul e outra rosa) e os heterohíbridos driver/driver (duas cadeias rosa). Na população de homohíbridos de tester/tester, a razão do gene X é superior à do cDNA da actina da população inicial do tester (Lorkowski e Cullen, 2003).

### 5. Análises em série da expressão genética (SAGE -*Serial Analysis of Gene Expression*)

A técnica de análises em série da expressão genética, conhecida como SAGE, foi criada por Velculescu e colaboradores em 1995. Esta técnica, de grande capacidade de processamento, permite obter uma medição detalhada de forma quantitativa e qualitativa da expressão genética, não requerendo conhecimento prévio da sequência (Velculescu *et al.*, 1995; Velculescu *et al.*, 2000).

O SAGE baseia-se em dois princípios: 1) uma pequena sequência de nucleótidos-etiqueta (9 a 10 bp) derivada de uma posição definida dentro de um

transcrito contem informação suficiente para identificar unicamente o transcrito. Esta etiqueta é utilizada para identificar genes e a abundância relativa desse transcrito dentro do mRNA; e 2) a concatenação das pequenas sequências-etiqueta permite a análise eficiente dos transcritos de forma seriada, pela sequenciação de múltiplas etiquetas dentro de um clone (Velculescu *et al.*, 1995; Tuteja e Tuteja, 2004).

A técnica SAGE original descrita por Velculescu *et al.* (1995) começa pela síntese de cDNA complementar ao mRNA, utilizando um *primer* oligo(dT) marcado com biotina. O cDNA é então digerido por endonucleases de restrição (enzimas de “âncora”) Nla III, dando origem a fragmentos de cDNA, com extremo 3', marcados com biotina com capacidade para se ligar a *beads* de estreptavidina. Os restantes fragmentos são eliminados. Uma vez que a endonuclease Nla III apresenta sítios de reconhecimento de 4 bp, digerirá, em média, 256 (44) bp em cada transcrito. Dado que quase todos os transcritos de mRNA são maior do que 256 nucleótidos, a enzima irá virtualmente digerir todos eles. O extremo 3' dos fragmentos de cDNA é o resultado da digestão que dividiu o cDNA em duas porções ligadas a dois *linkers* diferentes (A e B) que contêm os sítios de reconhecimento para a enzima de restrição *tagging* (enzima do tipo IIS) Bsm FI. Fragmentos pequenos designados por etiquetas são libertados por meio da digestão com a enzima Bsm FI, capaz de cortar em cada 13 a 14 bp a juzante do sítio de reconhecimento. Criam-se então extremos coesivos e as etiquetas dos conjuntos A e B ligam-se cauda a cauda para criar uma etiqueta dupla que contém os *linkers*. As etiquetas duplas com *linkers* são amplificadas por PCR e mais uma vez cortadas pela Nla III para as libertar destes. São separadas por electroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) e isoladas a partir destes, apresentando sequências CATG soltas em ambos os extremos, o que permite a ligação em grande concatemers de cDNA. Os concatemeros obtidos variam em tamanho, sendo unicamente os maiores fragmentos de moléculas de cDNA isoladas e clonadas em vectores de plásmidos, aumentando assim a eficiência de sequenciação do DNA. Por comparação das sequências dos concatemeros com bases de dados SAGE, pode ser obtida informação relativamente à etiqueta SAGE. São necessárias análises estatísticas para estabelecer diferenças significativas entre os níveis de determinados genes, presentes em diferentes livrarias. Teoricamente cada etiqueta SAGE é única para cada transcrito de gene. A sequenciação de um só clone pode identificar 30 a 50 mRNA diferentes (figura 9) (Velculescu *et al.*, 1995; Velculescu *et*

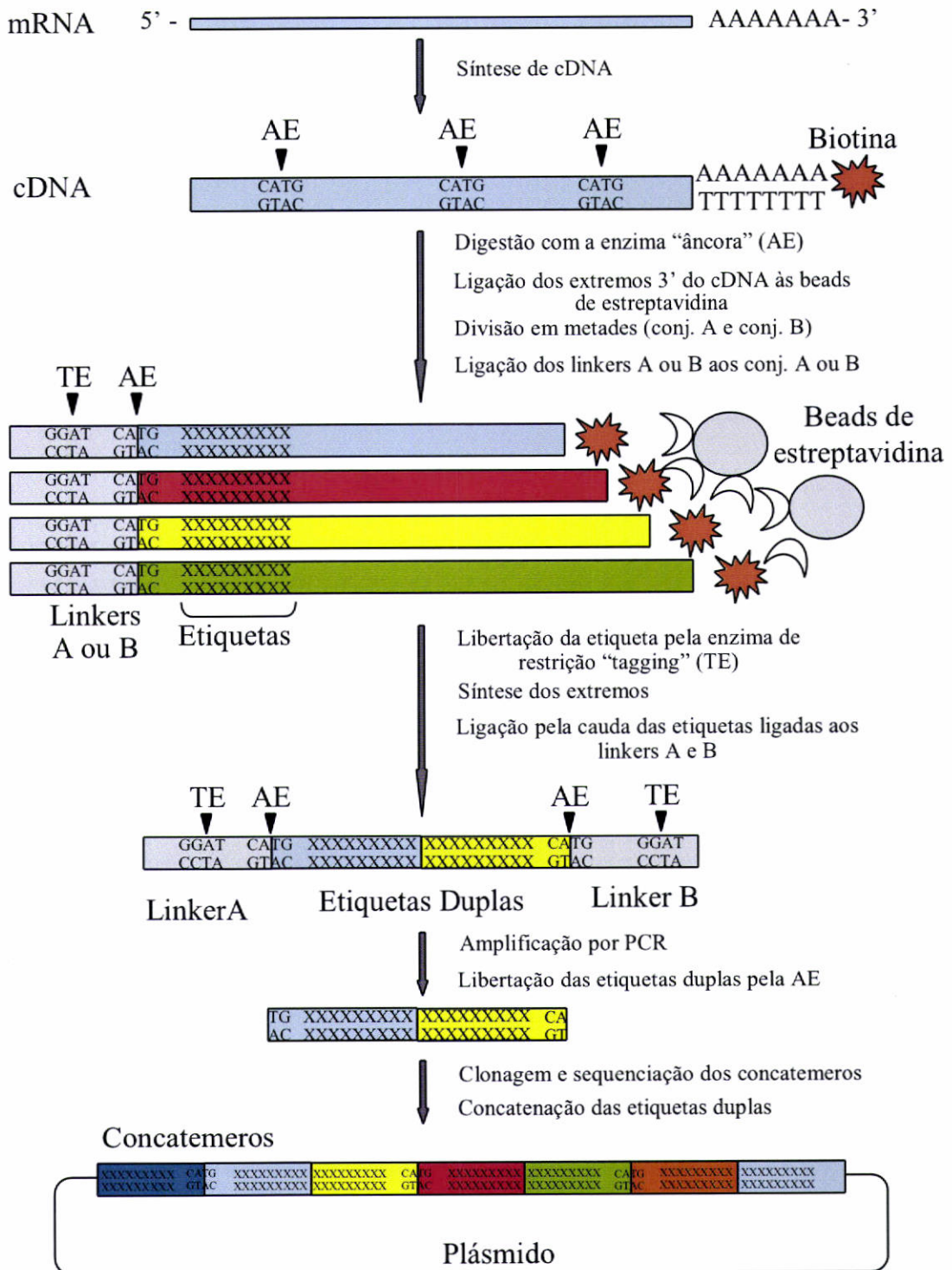
*al.*, 2000; Lorkowski e Cullen, 2003; Weeraratna, 2003; Tuteja e Tuteja, 2004a, b).

Está publicada uma enorme diversidade de estudos com a técnica SAGE. Em humanos esta técnica aplicou-se para estudar os sistemas circulatório, nervoso, digestivo e ocular, entre outros. Foi utilizada também para estudar o cancro na glândula mamária de humanos e de ratos. Igualmente, foi utilizado o SAGE na pesquisa veterinária, nomeadamente em bovinos mas também em ovinos (Berthier *et al.*, 2003; Maillard *et al.*, 2004, 2005; Tuteja e Tuteja, 2004c, Verlinden *et al.*, 2005).

Embora a técnica SAGE seja eficaz para determinar a expressão da população de mRNA, é necessária uma elevada quantidade de mRNA para a obtenção de etiquetas e de fragmentos de etiquetas duplas para a construção de boas livrarias SAGE. Com a intenção de reduzir a quantidade de mRNA necessária realizaram-se modificações à técnica original, criando o microSAGE, o miniSAGE, o PCR-SAGE, o SAGE-Lite e o SADE (Peters *et al.*, 1999; Virlon *et al.*, 1999; Neilson *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2000; Vilain *et al.*, 2003).

O principal inconveniente da técnica SAGE é a análise de etiquetas não identificadas que representam transcritos não caracterizados. Para a obtenção de mais informação sobre a nova sequência pode-se realizar uma variação da técnica SAGE, baseada na execução de uma RT-PCR com um *primer* que contém a etiqueta SAGE e com outro de “âncora” oligo(dT) de uma só base (Chen *et al.*, 2000). O produto da RT-PCR pode ser utilizado como sonda para Northern blot ou para hibridação *in situ*. Foi também desenvolvido um algoritmo para fundamentar a decisão de continuar a investigar etiquetas SAGE não identificadas, com base na especificidade de cada tecido (Moreno *et al.*, 2001). Recentemente, foi referido que a técnica SAGE é mais dispendiosa, mais trabalhosa e com menor capacidade de processamento do que métodos que se baseiam em *arrays* (Velculescu e Kinzler, 2007).





**Figura 9.** Representação esquemática da técnica SAGE. O RNA é obtido a partir de células ou de tecidos de interesse e transcrito para cDNA. Depois de digerir o cDNA com a enzima de “âncora” (AE), os extremos 3' ligam-se aos linkers. A enzima de restrição “tagging” (TE) reconhece o sinal de digestão no linker e digere a montante,

originando a libertação de pequenas etiquetas de cDNA. Essas etiquetas com linkers ligam-se em etiquetas duplas, sendo amplificadas por PCR, libertadas dos linkers por incubação com a enzima de “âncora” e ligadas em concatemos. Estes são clonados em plásmidos e sequenciados para obtenção de informação da expressão genética (Lorkowski e Cullen, 2003).

## **6. Reacção de transcriptase reversa de polimerase em tempo real (RT-PCR -*Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)**

A RT-PCR é a técnica mais sensível e mais flexível para caracterizar ou para confirmar os padrões de expressão dos genes e para comparar os níveis de amostras de mRNA de diferentes populações, fazendo com que seja uma das técnicas mais utilizadas para quantificação do mRNA (Loitsch *et al.*, 1999; Bustin, 2000; Bustin, 2002; Tricarico *et al.*, 2002).

O primeiro passo na RT-PCR consiste na realização de uma reacção de transcriptase reversa (RT), que sintetiza cDNA a partir de RNA, seguindo-se uma amplificação exponencial do cDNA numa reacção de PCR. Esta técnica emprega enzimas RNA e DNA polimerases que podem ser utilizadas em separado (duas enzimas/dois tubos) ou em conjunto (duas enzimas/ um tubo) (Bustin, 2000).

Existem actualmente várias técnicas que utilizam marcadores fluorescentes e que combinam processos de amplificação e de detecção de um alvo de RNA que permitem à monitorização das reacções de PCR em tempo real. Embora o método mais simples utilize marcadores fluorescentes como o SYBR<sup>®</sup> Green, é mais frequentemente utilizado para a realizar das reacções de RT-PCR o método da 5' nuclease (*5'-nuclease assay*), também conhecido vulgarmente como “TaqMan<sup>™</sup>”. Com o procedimento recomendado por “TaqMan<sup>™</sup>” pretende-se atingir um ponto de amplificação umbral ( $C_t$ ), obtido quando a amplificação do produto da PCR se detecta pela primeira vez. Assim o ciclo umbral é essencial para realizar a quantificação por este método. Para determinar este ciclo são recolhidos dados dos ciclos dez a treze da PCR, determina-se a fluorescência média e calcula-se o desvio-padrão. Depois realizam-se cálculos a fim de determinar qual o ciclo umbral. Este representa um umbral de detecção para o instrumento e está dependente do número de cópias do cDNA com que se inicia a

reação, mas também da eficiência de amplificação da PCR e de incorporação de sonda fluorescente. Quanto menos ciclos forem necessários para detectar o nível de fluorescência, maior é o número de cópias iniciais. No entanto, não nos podemos esquecer que o umbral foi determinado pelo operador, o que introduz um elemento subjectivo à quantificação em tempo real (Yin *et al.*, 2001; Lorkowski e Cullen, 2003; Lekanne Deprez *et al.*, 2002).

A sonda “TaqMan™” transporta um dador de fluorescência no extremo 5’, que emite fluorescência verde quando excitada por uma fonte de luz. O espectro de emissão sobrepõe-se ao de excitação de um fluoroforo de aceitação (“*quencher*”) que está ligado ao extremo 3’ do mesmo oligonucleótido. A excitação da molécula dadora no extremo 5’ origina a transferência de energia para o “*quencher*” e a emissão de uma luz fluorescente vermelha por parte deste. A sonda “TaqMan™” hibrida com o DNA desnaturalizado. Durante o processo de alargamento dos *primers* de PCR a sonda “TaqMan™” parte-se (*cleaved*) devido à actividade 5’-3’ exonuclease da polimerase de DNA. Os fragmentos dos oligonucleótidos originam que o extremo que transporta o fluoroforo e o extremo que transporta o “*quencher*” se dissociem da cadeia de DNA. Uma vez que a transferência de energia depende da distância entre os dois marcadores, o “*quencher*” deixa de transmitir luz vermelha, devido a não receber transferência de energia, sendo então detectável a luz verde emitida por o fluoroforo (figura 10) (Bustin, 2002; Lorkowski e Cullen, 2003).

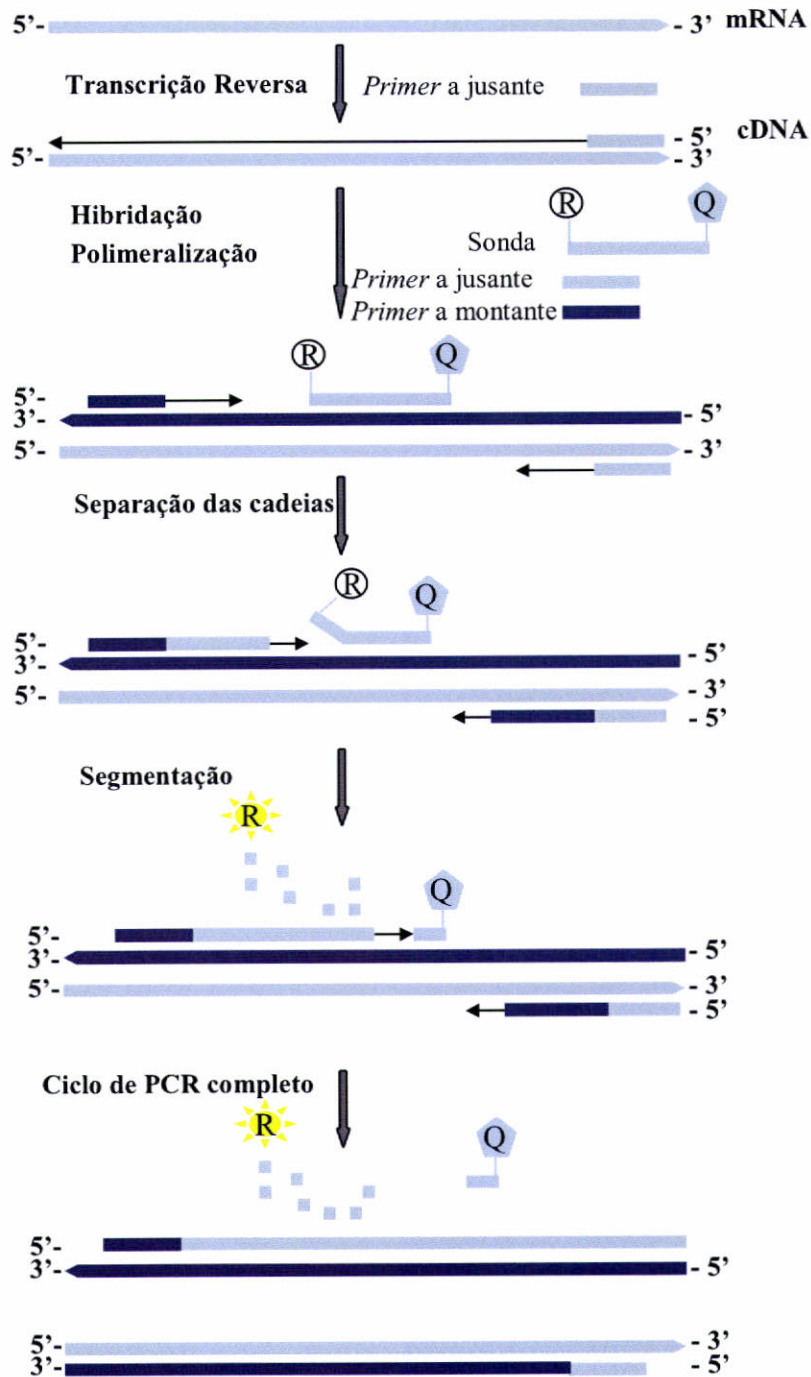
Um dos erros típicos na quantificação dos transcritos de mRNA obtidos pela RT-PCR é devido muitas vezes a variações na quantidade de material com que se inicia a experiência, mas também a erros do operador. Com a intenção de minimizar o erro proveniente das variações entre a quantidade de amostras, costuma-se utilizar um RNA celular, com intenção de ser uma referência interna pela qual os valores do RNA que pretendemos analisar podem ser normalizados. De uma maneira geral utilizam-se genes “*housekeeping*”, sendo mais frequentes o gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), a  $\beta$ -actina e o RNA ribossómico (rRNA) (Bustin, 2000; Schmittgen e Zakrajsek, 2000; Bustin, 2002; Glare *et al.*, 2002).

A técnica de RT-PCR aplica-se com frequência na saúde humana, como no estudo do cancro (Sun *et al.*, 2005), mas também em bovinos (Ontsouka *et al.*, 2004; Wall *et al.*, 2005; Zaros *et al.*, 2006), em ovelhas (Bonnet *et al.*, 2002), em galinhas

(Alves *et al.*, 2006) entre outros animais. Estudos em que foram utilizadas as técnicas de microarrays e de FDD na glândula mamária de bovinos e de ratas em diferentes fases de desenvolvimento com o intuito de encontrar expressão diferencial de genes implicados na regulação destes processos biológicos utilizaram a técnica de RT-PCR para confirmar a expressão diferencial de alguns desses genes (Rudolph *et al.*, 2003; Suchyta *et al.* 2003; Clarkson *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2006; Ron *et al.*, 2007).

Como inconveniente para a utilização desta técnica alguns autores referem que a variedade nos protocolos para a aquisição das amostras e o isolamento do RNA podem originar erros no processo de análise (Tricarico *et al.*, 2002). Existem também investigadores que consideram um problema o custo da realização desta técnica, devido à necessidade de termocicladores específicos, bastante dispendiosos (Loitsch *et al.*, 1999; Bustin, 2000). Uma das críticas principais à utilização desta técnica deve-se ao problema de identificação de uma referência válida para a normalização dos dados que permita a quantificação do mRNA de forma precisa e reproduzível (Bustin, 2000; Tricarico *et al.*, 2002).





**Figura 10.** O *assay 5'-nuclease*. Depois de realizar a transcrição reversa que sintetiza o cDNA a partir de mRNA, utilizam-se três oligonucleótidos de DNA para a PCR. Dois dos oligonucleótidos são *primers* específicos e um terceiro é uma sonda que hibrida com a cadeia amplificada durante a fase de hibridação e de extensão da PCR. Esta sonda contém um marcador fluorescente (R) no extremo 5' e um marcador



“quencher” (Q) no extremo 3'. Quando a sonda intacta é irradiada por laser, o marcador fluorescente excitado transfere energia para a molécula do “quencher” que está próxima, resultando num substrato não fluorescente. Devido à actividade 5'-3' da exonuclease que ocorre durante a polimerização da PCR, a sonda parte-se. A separação que ocorre entre o marcador fluorescente e o “quencher” faz com que não ocorra a transferência de energia entre eles, originando a emissão de energia do marcador fluorescente. Desta forma, em cada ciclo de PCR ocorre a hidrólise proporcional da sonda (Lorkowshi e Cullen, 2003).

## 7. Microarrays de DNA

A técnica de microarrays de DNA foi introduzida em 1995, por Schena e colaboradores. Esta técnica permite a medição simultânea da expressão diferencial de milhares de genes (Schena *et al.*, 1995; Kothapalli *et al.*, 2002; Rogler *et al.*, 2004; Zakharkin *et al.*, 2005).

O funcionamento dos microarrays de DNA utiliza as técnicas de hibridação convencionais, como o Northern e o Southern blot. Na produção dos microarrays de DNA imobiliza-se num suporte, com determinada disposição, uma sequência de ácidos nucleicos conhecida. Os ácidos nucleicos que se pretende investigar são marcados e hibridados com os ácidos nucleicos da superfície do array. Em condições ideais, o emparelhamento de bases Watson-Crick ocorre unicamente entre cadeias de ácidos nucleicos exactamente complementares. Além disso, em condições ideais, a intensidade do sinal detectado é directamente proporcional à quantidade de ácidos nucleicos presentes nas amostras e pode, portanto, ser medida (Lorkowski e Cullen, 2003; Sievertzon *et al.*, 2006).

Os microarrays de DNA podem ser classificados de baixa (80 a 200), média (500 a 10 000) ou alta densidade (10 000 a 80 000) relativamente ao número de sondas por centímetro quadrado. Embora se possam fabricar alguns microarrays de DNA de baixa e de média densidade nos próprios laboratórios de investigação, é mais frequente a aquisição dos microarrays de DNA por meio de casas comerciais (Spielbauer e Stahl, 2005; Dietel e Sers, 2006; Sievertzon *et al.*, 2006).

Na construção dos microarrays, milhares de elementos de DNA (DNA chip) são

incorporados num suporte sólido, que pode ser de vidro tratado, de silicone ou de nylon. As sequências de DNA podem ser fragmentos de cDNA ou oligonucleótidos e representam diferentes genes de interesse. Os fragmentos de cDNA são frequentemente seleccionados a partir de clones de cDNA de bases públicas de dados, ou de amplificações de segmentos de livrarias de cDNA e que depois de purificados são incorporados no suporte. Também frequentemente os fragmentos de cDNA são construídos a partir do produto de PCR (100 a 3 000 bp). Os oligonucleótidos (20 a 80 bp) podem ser sintetizados quimicamente e depois adicionados ao suporte ou sintetizados no suporte do array. Podem ser colocadas na superfície do array sequências de genes conhecidos, mas também sequências que representam “*expressed sequence tags*” (EST) que se caracterizam por serem pequenos fragmentos de sequências de DNA, frequentemente de comprimento que se situam entre 200 e 600 bases, que se originam pela sequenciação de um ou dos dois extremos de um gene e que apresentam potencial para investigar novos genes (Li *et al.*, 2002; Rogler *et al.*, 2004; Lettieri, 2006; Dietel e Sers, 2006; Draghici *et al.*, 2006; Sievertzon *et al.*, 2006).

Nesta técnica não se hibrida directamente ao array o mRNA do tecido que pretendemos investigar, uma vez que não existe sistema de detecção para os ácidos nucleicos não marcados. Por essa razão, realiza-se uma reacção de transcrição reversa que a partir de mRNA sintetiza cDNA. Uma vez que frequentemente existe pouca quantidade de tecido a partir do qual se começa a experiência e que a eficiência da reacção de transcrição reversa é baixa, obtem-se pouca quantidade de cDNA, o que não é suficiente para muitas experiências. Por isso, o cDNA deve ser amplificado, utilizando um método que evite alterações da razão entre as espécies de ácidos nucleicos. Para a amplificação do cDNA pode realizar-se uma PCR com poucos ciclos de amplificação, ou a transcrição *in vitro*. Quando se opta pela transcrição *in vitro*, adiciona-se um promotor à polimerase de RNA durante a transcrição reversa do mRNA. O cDNA é então amplificado de 100 a 1 000 vezes com a utilização da polimerase de RNA. Durante a transcrição *in vitro*, as moléculas de RNA são frequentemente marcadas com fluorescentes. No entanto, se o RNA não é limitante, o cDNA marcado pode ser directamente hibridado com o array. Foram descritas muitas alterações no procedimento de amplificação de RNA para aumentar a intensidade do sinal (Ivashuta *et al.*, 2002; Lorkowski e Cullen, 2003; Dietel e Sers, 2006; Sievertzon *et al.*, 2006).



De uma maneira geral utilizam-se dois procedimentos para estimar a expressão dos genes e, em particular, as diferenças na expressão dos genes entre amostras. Num desses procedimentos, os ácidos nucleicos marcados das duas amostras a comparar são hibridados com dois arrays idênticos. Para normalizar a intensidade do sinal de cada gene são utilizados estándares internos e/ou complexos métodos estatísticos. De uma maneira geral, podem-se utilizar como estándar internos genes “*housekeeping*” que apresentem uma razão de expressão constante. Em alternativa, pode-se utilizar a média da intensidade do sinal obtido para a normalização. Desenvolveram-se vários métodos para normalizar, calibrar e calcular a variação, a qualidade e a análise estatística dos microarrays. Para análise dos resultados de microarrays de cDNA provenientes de dados da glândula mamária foi desenvolvido especificamente um programa designado por *Microarray Explorer* (Lemkin *et al.*, 2000; Lorkowski e Cullen, 2003; Wurmbach *et al.*, 2002). Os resultados finais permitem obter um perfil da expressão genética indicando uma expressão elevada, baixa ou não existente, permitindo também inferir a ausência completa dos genes nas amostras em comparação (Dietel e Sers, 2006).

O segundo procedimento requer unicamente um array para duas amostras. Neste caso, as duas amostras são marcadas de forma diferente, geralmente com dois diferentes fluorocromos, por exemplo Cy3 e Cy5. A hibridação no array é realizada utilizando a razão de um para um para as sondas de ácidos nucleicos marcados. Os genes com níveis idênticos de expressão representam-se com uma cor misturada, enquanto nos genes com diferentes taxas de expressão, um dos fluorocromos é dominante sobre o outro (Lorkowski e Cullen, 2003).

Uma vez marcadas as amostras e depois de misturadas, são dissolvidas num tampão de hibridação e são aplicadas ao array. A hibridação é realizada em banhos com tampão de hibridação aquecido ou em estações de hibridação automatizadas durante 16 a 20 horas. De forma a evitar hibridações dentro das amostras, mas permitindo a formação de duplex específicas entre as sondas e as amostras, as condições de hibridação têm de ser optimizadas quer na temperatura quer na composição do tampão. O pré-tratamento do suporte reduz a fluorescência que não resulte da hibridação entre as sondas e as amostras. Depois da hibridação, o suporte é várias vezes lavado, de forma a permitir a eliminação de DNA que não hibridou e de partículas de sujidade, possibilitando no entanto manter as ligações específicas (Sievertzon *et al.*, 2006).

Embora seja mais comum, em microarrays de elevada densidade, a utilização de marcadores fluorescentes, também existem propostas de utilização de chips em que a detecção do DNA é eléctrica (Moeller e Fritzsche, 2005). Nos microarrays de baixa e de média densidade pode-se também utilizar a marcação por radioactividade (Richmond *et al.*, 1999; Lorkowski e Cullen, 2003).

É mais frequente que os microarrays de DNA se apliquem à análise dos níveis de expressão de RNA, mas também se pode aplicar na descoberta de genes a identificação de sequências, muitas vezes não codificantes, a realização de mapas, a detecção de polimorfismos e a estudos de hibridação cruzada, por exemplo entre genes ortólogos de humanos e de bovinos (Korenberg *et al.*, 1995; Adjaye *et al.*, 2004; Spielbauer e Stahl, 2005; Hüttenhofer e Vogel, 2006). Portanto, os microarrays contribuem com muitos estudos para a saúde humana, nomeadamente no estudo do cancro (Rody *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2006), mas também na nutrição (Spielbauer e Stahl, 2005) e na segurança alimentar (Roy e Sen, 2006). Também recentemente foi aplicada esta tecnologia ao estudo da toxicologia e da ecotoxicologia (Lettieri, 2006).

Embora ainda nas primeiras fases de desenvolvimento, foi proposta a utilização de novas áreas de aplicação, como a análise da epigenética no genoma (Hoheisel, 2006). A utilização dos microarrays para quantificar a expressão genética criou um impulso ao desenvolvimento de microarrays para o estudo do perfil da expressão de proteínas (Talapatra *et al.*, 2002; LaBaer e Ramachandran, 2005; Collett *et al.*, 2005). Foi aplicada esta técnica ao estudo em animais, como as ovelhas (Kim *et al.*, 2003; Leroux *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2006). Estudos com microarrays de DNA realizados na glândula mamária de bovino e de rato parecem demonstrar entre outras coisas que no período da lactação se expressam predominantemente os genes que codificam proteínas do leite. Entre outros, também se observou a expressão diferencial de genes relacionados com o metabolismo energético (Lemkin *et al.*, 2000; Master *et al.*, 2002; Rudolph *et al.*, 2003; Suchyta *et al.* 2003; Clarkson *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004; Ron *et al.*, 2007).

Embora a técnica de microarrays seja muito utilizada, apresenta algumas limitações, relativamente à sensibilidade, à precisão e à reprodutibilidade dos resultados. Os dados sugerem que alterações na expressão de transcritos relativamente abundantes podem ser facilmente detectadas, mas são difíceis de conseguir medições

precisas do nível de expressão e a detecção de genes pouco abundantes. O problema parece surgir por um desenho não de todo correcto, pela má escolha das sondas ou pela incorrecta anotação destas. A solução parece passar por uma correcta análise dos resultados (Draghici *et al.*, 2005). Também os estudos que pretendem comparar os resultados da medição da expressão de genes gerados a partir de preparações de RNA utilizando três plataformas de arrays disponíveis comercialmente demonstrou divergências consideráveis entre as diferentes plataformas (Tan *et al.*, 2003; Bammler *et al.*, 2005). Igualmente parece ser considerada inconveniente a quantidade de dados obtidos com a técnica de microarrays, uma vez que o total das “medições” obtidas é muitas vezes de difícil interpretação na biologia celular (Brenner, 1999). Também são muito limitantes os custos inerentes à utilização da técnica de microarrays, devido ao material necessário (Bustin, 2000; Sievertzon *et al.*, 2006).

#### **8. Aplicação das técnicas de differential display e de microarrays no estudo da expressão diferencial de genes na glândula mamária de animais lactentes e não lactentes**

Nos últimos anos têm sido publicados estudos realizados com o intuito de identificar vários genes que se expressam de forma diferencial na glândula mamária em várias etapas do seu desenvolvimento nomeadamente nas fases lactentes e não lactentes (Lemkin *et al.*, 2000; Master *et al.*, 2002; Rudolph *et al.*, 2003; Suchyta *et al.* 2003; Burke *et al.* 2003; Clarkson *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2006; Ron *et al.*, 2007). A maioria desses estudos foi realizado na glândula mamária de ratas e só um foi efectuado em ruminantes (vacas) (Suchyta *et al.*, 2003) e a técnica de eleição foi a de microarrays, sendo a de differential display empregue por Burke *et al.* (2003) e a sua variante fluorescente (differential display Fluorescente - FDD) utilizada no estudo de Nakamura *et al.* (2006). Com excepção do trabalho realizado por Lemkin *et al.* (2000) que utilizou a técnica de Northern blot, a confirmação da expressão diferencial de alguns dos genes obtidos nestes estudos realizou-se com a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR). A continuação apresenta-se um resumo dos resultados obtidos nesses estudos.

No estudo realizado por Suchyta *et al.* (2003) foi comparado o perfil de

expressão dos genes de tecido de glândula mamária de bovino não lactente e lactente com a utilização da técnica de microarrays preparado com transcritos de glândula mamária de bovinos. Nesse trabalho comparou-se a expressão diferencial de tecido mamário de duas vacas em lactação (animal 1 e animal 2) com o tecido mamário de uma vaca não lactente. Esses autores observaram um total de 75 genes que se expressam mais no animal 1 quando comparado com glândula mamária da vaca não lactente e 112 genes com maior expressão no animal 2 quando comparado com o animal não lactente. Foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) para corroborar a expressão diferencial de alguns genes que se observaram com a técnica de microarrays. As proteínas do leite constituem a maioria das proteínas que se expressam na glândula mamária em lactação e portanto, como seria de esperar, os genes que codificam as caseínas ( $\alpha$ -s1- e  $\beta$ -) encontram-se entre os que apresentam uma maior expressão em animais lactentes comparativamente com não lactentes. Um total de 77 genes do animal 1 e 141 genes do animal 2 expressaram-se significativamente menos no tecido da glândula mamária dos animais lactentes comparativamente com o não lactente. Muitos dos genes que se expressam de forma diferencial identificados nesse estudo foram pela primeira vez associados à lactação. Por exemplo o gene *LASP1* que se localiza no cromossoma 19 dos bovinos foi primeiramente identificado no cancro da mama. Pensa-se que o facto do gene *LASP1* se expressar mais na glândula mamária em lactação se poderá dever à sua relação com a sua função na regulação da migração celular por meio da sua interacção com citoesqueleto de actina. Observaram também um aumento da expressão durante a lactação de um gene responsável pelo início da apoptose (Caspase) e dois oncogenes responsáveis pela divisão celular (*VAV3* e *C-mys*). No entanto, já antes se observaram na glândula mamária de cabra durante o período da lactação uma expressão aumentada de vários genes relacionados com a apoptose (Wareski *et al.*, 2001). Igualmente identificaram a existência de outros genes que se expressam mais na lactação mas não foi possível encontrar homologia com genes conhecidos. Dos genes observados com menor expressão em tecido mamário em animais em lactação, estes autores destacam o gene que codifica uma enzima desintoxicante glioxalase I, que frequentemente se expressa no mesmo tecido em condições de tumor. Estes autores observaram que muitos genes exibem expressão diferencial entre os animais em estudo, destacando os genes que codificam as proteínas do leite, os genes implicados na

indução/repressão da apoptose, os genes relacionados com o ciclo celular e o metabolismo energético. Nesse trabalho foi extraído RNA de todo o tecido da glândula mamária dos animais em análise.

A equipa de Ron *et al.*, 2007, estudou com a técnica de microarrays a expressão diferencial de genes na glândula mamária de ratas na puberdade (uma fêmea), na gestação (duas fêmeas), na lactação (duas) e no desmame (duas) para que com a ajuda de mapas de comparação poder identificar genes candidatos para o estudo de *Quantitative Trait Loci* (QTLs) que afectem a produção de leite em bovinos. Nesse estudo verificaram a existência de 87 genes com expressão mais elevada unicamente na lactação, e ainda outros 72 genes que durante a lactação apresentaram uma expressão aumentada e diferencial comparativamente com algum dos outros estados de desenvolvimento da glândula mamária (puberdade, adulta e desmame). Típicos da lactação destacam-se os genes relacionados com as proteínas do leite como o gene da caseína  $\alpha_{s2}$  (CSNd) e com a síntese do leite como é o caso do péptido semelhante a hormona da paratiróide (PTH1H) responsável pela regulação da concentração do ião cálcio no sangue e da enzima galactosiltransferase (B4GALT1) essencial para a síntese do açúcar do leite. Por seu lado, quinze genes apresentaram maior expressão no período de desmame e trinta e dois genes aumentaram a sua expressão unicamente durante a gestação. Um grupo de seis genes expressa-se mais durante a puberdade e menos na lactação. Assim, através da comparação de mapas genéticos foram identificados genes candidatos para QTL em todos os cromossomas de bovinos com excepção de dois autossomas. O número de genes candidatos para QTL por cromossoma variou entre 1 e os 17. A informação resultante desse estudo pode ser consultada na página web [<http://cowry.agri.huji.ac.il/QTLMAP/qtlmap.htm>]. Nessa pesquisa foi extraído RNA de tecido gordo de glândula mamária em todos os animais em análise.

A investigação realizada por Nakamura *et al.*, (2006) pretendeu estudar os genes implicados no início do período de desmame da glândula mamária de ratas utilizando a técnica de differential display fluorescente (FDD) e os resultados foram confirmados com a técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) utilizando para a normalização a expressão do gene GAPDH. Nesta investigação o RNA total necessário foi obtido a partir de tecido da glândula mamária de uma rata na fase de lactação (dia 10) e de outra fêmea dois dias depois de parar a amamentação. Outros autores como Rudolph *et al.*,

2003; Clarkson *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004, também estudaram a glândula mamária na fase de desmame, utilizando a técnica de DNA microarrays. No entanto, tal como Nakamura *et al.*, (2006) mencionam, embora se possa obter muita informação sobre o nível de expressão de vários genes com os microarrays disponíveis no mercado, os estudos pioneiros cobrem menos da metade dos genes estimados na base de dados genómico do rato (*Mouse Genome Sequencing Consortium*, 2002). Por isso, com o objectivo de obter mais informação sobre os genes que se expressam mais na fase de desmame estes autores pesquisaram os genes utilizando a differential display fluorescente (FDD). Estes autores obtiveram expressão diferencial em cinco genes relacionados com a expressão de proteínas ligadas à defesa contra o stress oxidativo e/ou contra as infecções das bactérias.

Em 2004, Clarkson *et al.*, utilizaram a técnica de microarrays para estudar a expressão diferencial dos genes de tecido da glândula mamária de ratas durante o ciclo de desenvolvimento desde a puberdade, à gestação, à lactação até ao desmame, dando especial atenção a este último período. Para isso utilizaram glândula mamária de seis animais em cada período em estudo. Estes autores observaram durante a lactação um aumento da expressão dos genes relacionados com a síntese do leite (ácidos gordos) e com o metabolismo. No seu trabalho estes autores também sugerem que existem diferentes mecanismos de apoptose em diferentes fases de desmame nas células da glândula mamária, observando-se que em dado momento as mitocôndrias interferem nesse mecanismo. Este autores apesar de ter observado alterações significativas da expressão do gene que codifica a GAPDH, não contemplaram alterações significativas da expressão dos genes como o rRNA 18S e o  $\alpha$ -actina durante o ciclo de desenvolvimento da glândula. Nesse trabalho a excisão do tecido da glândula mamária dos animais em estudo realizou-se, sempre sobre a mesma hora do dia, para evitar o efeito causado pelo ritmo circadiano. Antes da ablação da glândula mamária foram removidos os nódulos linfáticos.

Em 2004, Stein *et al.*, estudaram também a expressão diferencial de genes da glândula mamária de ratas no decorrer da puberdade, da gestação, da lactação e de desmame, utilizando em cada fase três animais. Como controlo da técnica de microarrays utilizaram genes cujo padrão de expressão é conhecido como é o caso das proteínas do leite, uma vez que a sua expressão aumenta durante a gestação atingindo



um máximo na lactação, relativamente às outras fases. No entanto, estes autores debruçaram-se prioritariamente no estudo dos genes mais activos na fase de desmame (depois da fase secretória). Utilizou-se a técnica de PCR em tempo real para validar a expressão diferencial de alguns genes que se observaram com a técnica de microarrays. Estes autores antes da ablação da glândula mamária de ratas em estudo, realizaram uma remoção dos nódulos linfáticos.

A técnica de differential display foi utilizada por Burke *et al.* (2003) para detectar o aumento dos níveis de mRNA da catepsina L na glândula mamária de ratas na fase de desmame quando comparadas com animais gestantes e em lactação. Neste estudo foi extraído RNA de glândula mamária de uma fêmea em cada fase. O aumento desta protease dos lisossomas aumenta 24 horas depois do desmame parecendo estar relacionada com a apoptose celular. A confirmação dos resultados obtidos com differential display foram confirmados pelo método de Northern blot.

O estudo realizado por Rudolph *et al.* (2003) com a técnica de microarrays na glândula mamária de ratas durante as fases de gestação, de lactação e de desmame permitiu observar que a expressão dos genes das proteínas do leite aumenta no decorrer da gestação, e a expressão dos genes para a síntese de lípidos se incrementa rapidamente com o início da lactação. Foram recolhidas glândulas mamárias de quatro fêmeas em cada período em estudo. Na excisão da glândula mamária estes autores tiveram atenção para remover os nódulos linfáticos e evitaram que na amostra de glândula existisse músculo ou gordura.

O grupo de investigação de Master *et al.*, 2002 pretendeu analisar os genes implicados nas distintas fases de desenvolvimento da glândula mamária de ratas durante a puberdade, o estado adulto, a gestação, a lactação e o desmame com a técnica de microarrays, utilizando aproximadamente 20 animais em cada etapa do estudo. Neste trabalho observou-se que os genes com maior expressão durante a lactação estão associados com várias categorias de genes, como as proteínas do leite, a síntese de proteínas e o transporte de proteínas. As proteínas do leite que se observam são as caseínas, as WAP, e o glóbulo de gordura do leite EGF factor 8. Os genes associados com a síntese de proteínas incluem aminoacil-tRNA sintetases, necessárias para a síntese de proteínas do leite. Os genes relacionados com o transporte de proteínas incluem sequencias que codificam componentes do complexo responsável pelo

transporte para o retículo endoplasmático, assim como outros genes implicados na secreção de proteínas. Também se observou uma maior expressão de genes relacionados com a síntese *de novo* dos ácidos gordos, com a diferenciação epitelial mamária e o estímulo da degradação dos lípidos dos adipócitos.

Lemkin e seus colaboradores (2000) desenvolveram um programa de computador (Microarray Explorer) com o intuito de analisar os dados resultantes da técnica de microarrays de cDNA quando esta é aplicada ao estudo de tecido proveniente da glândula mamária. Para isso estes investigadores utilizaram tecido da glândula mamária de quatro ratas durante a gestação e de igual número durante a lactação. Estes autores também observaram que os genes relacionados com as proteínas do leite, nomeadamente as caseínas são os que mais se expressam em animais em lactação quando comparados com animais em gestação. A confirmação da expressão diferencial foi realizada com a técnica de Northern blot.



## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### A. Desenho Experimental

A glândula mamária pode ser utilizada como modelo para analisar o controlo da expressão de genes em tecidos que experimentam diferentes estados de desenvolvimento, fisiológico ou produtivo. Neste trabalho pretendeu-se estudar a expressão diferencial de RNA mensageiro na glândula mamária de ovelhas Churra em diferentes estados produtivos: não-lactente, lactente com baixa produção e lactente com elevada produção. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos e descritos na bibliografia existente.

Para isso, elegeram-se 9 animais de raça Churra pertencentes a uma exploração inscrita na Associação Nacional de Criadores da Raça Churra de Espanha (ANCHE).

Os animais a estudar distribuem-se em três grupos diferentes, em função do estado fisiológico e/ou produtivo, tal como se indica:

**Grupo 1:** 3 ovelhas entre a 5<sup>a</sup> e a 7<sup>a</sup> semana de lactação, com um historial de elevada produção leiteira, filhas de sementais com maior valor genético (figura 11);

**Grupo 2:** 3 animais entre a 5<sup>a</sup> e a 7<sup>a</sup> semana de lactação, com um historial de baixa produção leiteira, filhas de sementais com valores negativos (figura 11);

**Grupo 3:** 3 animais em período não-lactente, escolhidos ao acaso.

Na tabela 1 indica-se a que grupo pertence cada ovelha estudada, o número de identificação e o historial produtivo (número de partos, produção média de leite aos 120 dias, decil genético e valor genético para a produção de leite (VGL)).

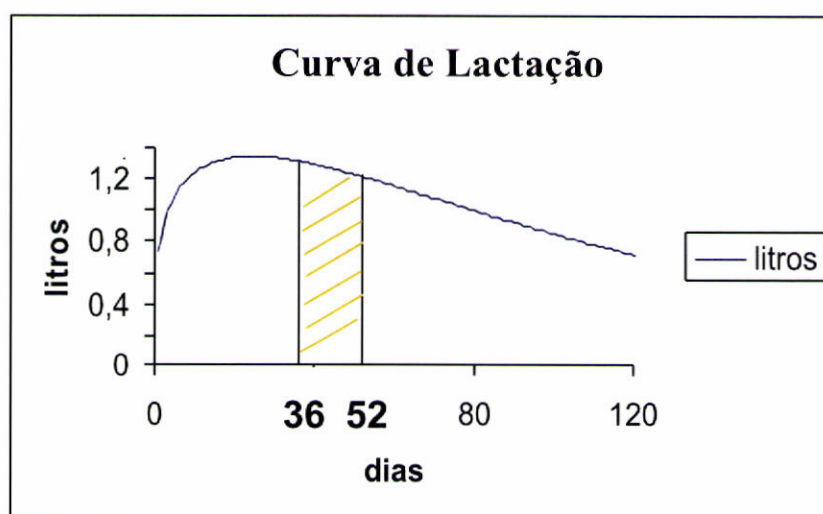
**Tabela 1.** Historial produtivo de cada animal estudado.

Grupo de estudo	Ovelha / nº	Nº. de Partos	Leite (120 d)	Decil Genético	VGL* <sup>1</sup>
1	BR99082 / 1	2	143	8	12,79
	BR98072 / 2	6	199	9	21,67
	BR97248 / 3	3	161	8	12,21
2	BR98089 / 4	4	73	0	-14,40
	BR95250 / 5	5	106	0	-13,95
	BR95363 / 6	3	102	0	-16,65
3	BR95172 / 7	9	204	9	25,44
	BR96065 / 8	7	86	0	-9,33
	BR97201 / 9	1	21	N.D* <sup>2</sup>	N.D* <sup>2</sup>

VGL\*<sup>1</sup> = Valor Genético para Produção de Leite

N. D\*<sup>2</sup> = Não Determinado

(Na ovelha Churra a produção média é de 128 litros de leite, normalizada a 120 dias)



**Figura 11.** Curva de lactação média da ovelha Churra. Os animais na fase produtora de leite dos grupos 1 (elevada produção) e 2 (baixa produção) foram sacrificados entre os dias 36 e 52 depois do parto.

A decisão de utilização de DD baseou-se no facto de esta ser uma das técnicas mais frequentemente utilizada em variados organismos eucariontes para a identificação de genes com expressão diferencial, nomeadamente na glândula mamária de animais produtores de leite (Burke *et al.*, 2003; Schwerin *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2006), sem ser necessário o prévio conhecimento das sequências. Também foi intencional na tentativa de concretização dos nossos objectivos a utilização do Kit “RNA Image” (GenHunter) na metodologia de DD uma vez que este é recomendado por um dos criadores da técnica (P. Liang) sendo este kit talvez o mais frequentemente aplicado quando se realiza DD (Liang e Pardee, 1992; Liang *et al.* 2007). Dado tudo isto, somado ao facto do equipamento necessário à realização de DD se encontrar disponível nos laboratórios da Universidade de León, a eleição desta técnica pareceu-nos a mais lógica.

É do conhecimento geral que os resultados obtidos por DD (bandas candidatas) necessitam de ser validados por outras técnicas como Northern blot ou RT-PCR. A hibridação Northern permite a detecção de sequências específicas nas preparações de RNA. No entanto, apesar das suas múltiplas vantagens a tornar a mais utilizada, e de ser empregue com sucesso na confirmação de sequências obtidas com DD na glândula mamaria é semiquantitativa não permitindo facilmente a análise “fina” da expressão de genes (Burke *et al.*, 2003; Liang *et al.* 2007). Por seu lado, a técnica de reacção de transcriptase reversa de polimerase em tempo real quando bem utilizada é considerada uma técnica quantitativa. Esta técnica apresenta assim uma vantagem sobre a Northern blot pois permite uma análise mais “fina” da expressão de sequências específicas. No entanto, a realização da técnica de RT-PCR, necessita de equipamento específico, tais como termocicladores bastante dispendiosos (Loitsch *et al.*, 1999; Bustin, 2000), que infelizmente não se encontravam disponíveis nos laboratórios da Universidade de León. Por isso, e devido à certeza da técnica de Northern blot ter sido aplicada múltiplas vezes com sucesso na confirmação de bandas candidatas obtidas com DD optamos por emprega-la também no nosso estudo.

Nos laboratórios da ULE empregou-se a técnica de DD nos animais do grupo 1 e 2. Devido ao baixo número de bandas candidatas para a expressão diferencial obtidas entre estes dois grupos de animais decidimos incluir no nosso estudo as ovelhas do grupo 3. Assim, foi enviado para os laboratórios de GenHunter (USA) mRNA extraído da glândula mamária de ovelhas de todos os grupos em estudo. No laboratório da ULE

confirmou-se, empregando a técnica de hibridação Northern blot, a expressão diferencial das bandas candidatas obtidas no laboratório de GenHunter em todos os animais em estudo.

## **B. Universidade de León**

O trabalho desta tese foi realizado na Universidade de León (ULE), nos laboratórios do Departamento de Produção Animal I no Instituto de Desenvolvimento Agrário e da Instalação Radioactiva. Nestes laboratórios empregou-se a técnica de differential display no úbere de ovelhas com historial de elevada e de baixa produção leiteira. Foi também confirmada na ULE a expressão diferencial das bandas candidatas (obtidas por DD) em todos os animais em estudo (ovelhas lactentes com elevada produção de leite lactentes com baixa produção de leite e de ovelhas no período não lactente).

Para confirmar os resultados obtidos com a técnica de DD na ULE, também foi enviado RNA total extraído da glândula mamária de todos os animais em estudo para análise differential display no laboratório GenHunter (USA).

### **1. Recolha do material biológico**

A recolha do material biológico foi efectuada em duas vezes. O primeiro abate de seis ovelhas de raça Churra realizou-se na Universidade de León. Destes animais, três de elevado nível de produção láctea e de igualmente baixo nível de produção, recolheram-se, imediatamente depois do abate, amostras das glândulas mamária e supra-renal, assim como de outros tecidos: adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, hipófises, músculo, pulmão, rim, tiróide e útero, para além de sangue. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogénio líquido até ao seu armazenamento numa arca congeladora a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Na segunda vez, recolheram-se no matadouro de Palencia amostras de glândula mamária de três ovelhas em fase não produtiva de leite. Tal como anteriormente, foram conservadas em nitrogénio líquido até terem sido guardadas numa câmara congeladora a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2. Obtenção do RNA**

### **2.1. Preparação do laboratório para o trabalho com RNA**

É do conhecimento geral que os maiores inimigos da integridade do RNA são as RNases, enzimas importantes no metabolismo e na regulação dos ácidos nucleicos em eucariontes e em procariontes, muito estáveis e difíceis de inactivar.

As fontes mais comuns de contaminação com RNases são as bactérias e os fungos, que podem estar presentes na pele, nas partículas do ar ou no material do laboratório.

Dado que as fontes mais importantes de contaminação com as RNases são os tampões contaminados, os aparelhos de pipetar automáticos e as luvas, os problemas derivados das RNases exógenas podem ser minimizados mediante a utilização de medidas profiláticas. Neste sentido, as principais precauções tomadas para diminuir contaminações foram a realização de alíquotas dos tampões, o emprego de aparelhos de pipetar automático unicamente para trabalhar com RNA e a utilização de luvas durante a realização de todo o trabalho. Qualquer elemento suspeito de estar contaminado foi sempre eliminado.

### **2.2. Extracção do RNA total**

O procedimento utilizado para a extracção do RNA total da glândula mamária foi baseado na metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987) e foi realizado mediante a utilização do reactivo TRI Reagent<sup>TM</sup> de Sigma<sup>®</sup>.

Este produto consiste numa mistura de tiocianato de guanidina e fenol numa solução de monofase capaz de dissolver o DNA, o RNA e as proteínas em amostras de tecidos homogeneizados. Para o nosso trabalho, unicamente foi utilizada a fracção do extracto que continha RNA.

Os tecidos foram homogeneizados em TRI Reagent<sup>TM</sup> (1 ml para cada 50-100 mg de tecido), utilizando um homogeneizador (Kinematica<sup>®</sup>) aproximadamente durante 45 segundos. Com o objectivo de conseguir uma dissociação dos complexos de nucleoproteínas, as amostras foram incubadas durante 10 minutos a temperatura



ambiente e centrifugadas a 12 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Depois de transferir a fase aquosa para um tubo novo, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio a cada amostra, misturadas vigorosamente e, após uma incubação de 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugadas a 12 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.

A centrifugação separou a mistura em três fases: uma inferior de tonalidade vermelha que contém proteínas, uma interfase que inclui o DNA e uma fase aquosa superior, na qual se encontra o RNA. Dado que no nosso trabalho unicamente nos interessou a fase superior, esta foi transferida para um tubo novo, com o fim de obter melhor eliminação das proteínas e do DNA contaminante das amostras, tendo-se adicionado novamente 1 ml de TRI Reagent™. Após deixar cada amostra incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio, misturadas vigorosamente e, depois de uma incubação de 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugadas a 12 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.

Obteve-se mais uma vez uma mistura com três fases diversas, das quais unicamente nos interessou a superior, que contém o RNA. Por isso, transferiu-se a fase superior para um tubo novo e, com o fim de precipitar o RNA, adicionou-se 0,5 ml de isopropanol. As amostras foram mantidas durante 10 minutos à temperatura ambiente e seguidamente centrifugadas a 12 000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. O RNA precipitou-se no fundo do tubo e, após ter sido eliminado o sobrenadante, foi lavado mediante a adição de 1 ml de etanol de 75% (v/v) sendo depois centrifugado a 7 500 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi eliminado e o RNA foi deixado secar brevemente. Por último, foi suspenso em 0,1 ml de água tratada com DEPC, contendo 0,1 mM de EDTA (pH 7,5). As amostras foram armazenadas a -80°C até à sua utilização.

### **2.3. Eliminação do DNA contaminante**

Segundo alguns autores, a degradação do RNA e a contaminação com DNA são as principais causas de resultados falsos positivos na técnica de DD (Liang *et al.*, 1993; Colonna-Romano *et al.*, 1998).

Por esta razão, aconselha-se a que, de forma rotineira e antes de se realizar a técnica DD, as amostras de RNA sejam limpas da contaminação com DNA (Liang *et*

*al.*, 1993). No nosso estudo, optámos pelo tratamento do RNA com DNase I (Roche®) a uma concentração de 10 U por 50 µg de amostra de RNA. A mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos, após o que se inactivou a enzima durante 10 minutos a 75°C.

#### **2.4. Quantificação e estimativa da pureza do RNA**

A concentração do RNA foi determinada mediante a medição da absorção (ou densidade óptica) a uma longitude de onda de 260 nm num espectrofotómetro (GeneQuant II - Pharmacia Biotech). A leitura foi realizada depois de se fazer uma diluição de 1:1000 das amostras de RNA em água milli-Q. Os valores obtidos permitiram calcular a concentração de RNA nas amostras, dado que se sabe que  $A_{260}=1$ , corresponde a aproximadamente 40 µg/µl de RNA.

Para calcular a pureza do RNA foram igualmente realizadas leituras numa longitude de onda de 280 nm. A razão entre leituras a 260 nm e a 280 nm proporciona uma estimativa do grau de pureza dos ácidos ribonucleicos.

Para o nosso estudo unicamente foram consideradas as preparações de RNA que apresentaram a razão  $A_{260/280}$  compreendida entre 1,7 e 2,0.

#### **2.5. Verificação da integridade do RNA**

Para a comprovação da integridade do RNA total de cada amostra foi utilizada a técnica de electroforese em gel de agarose. As electroforeses foram realizadas em géis de agarose ao 1%, TBE 1X e em brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Em cada poço do gel colocou-se 5 µg de RNA de cada amostra com tampão de carga (ficol 1X).

A migração das amostras de RNA foi realizada numa cuvete de electroforese horizontal, após a completa imersão do gel em tampão TBE 1X. Para isso se aplicou uma voltagem constante de 100 vóltios, durante um período aproximado de 30 minutos. As amostras foram visualizadas num transiluminador de luz ultravioleta. Foram consideradas válidas as amostras de RNA em que se pode observar de forma nítida as bandas (rRNA 28S e rRNA 18S).

### 3. Differential display

A técnica de differential display foi realizada mediante o sistema “*RNA image*” (*GenHunter Corporation*), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e segundo se detalha a continuação.

#### 3.1. Reacção da transcriptase reversa (RT)

O primeiro passo consiste na obtenção do cDNA a partir do RNA mensageiro, mediante uma reacção da transcriptase reversa. A reacção começa com a hibridação de um *primer* oligo-dT à cauda de poli (A) do mRNA, a partir da qual tem lugar a síntese da cadeia de cDNA correspondente. A técnica que descrevemos utiliza *primers* H-T<sub>11</sub>M, donde M pode ser adenina (A), citosina (C) ou guanina (G). Estes *primers* empregam-se em reacções separadas, o que limita o número de cadeias que se transcrevem por reacção, facilitando a identificação posterior dos fragmentos que amostram expressão diferencial.

Cada reacção foi realizada num volume final de 20 µl, com a seguinte composição: RNA total (0,2 µg), *primer* H-T<sub>11</sub>M (0,2 µM), dNTPs (20 µM), tampão de reacção 1X (Tris-HCL 25 mM pH 8,3, KCl 37,6 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 5 mM DTT) e transcriptase reversa MMLV (100 unidades). O protocolo de incubação, realizado num termociclador (Perkin-Elmer 9 700), foi o seguinte: 65°C durante 5 minutos, 37°C durante 60 minutos e 75°C durante 5 minutos. A enzima MMLV foi adicionada depois de que os tubos permanecerem 10 minutos a 37°C, e foi inactivada posteriormente a 75°C. O produto final foi armazenado a 4°C para o seu emprego imediato ou a -20°C para a sua utilização posterior.

#### 3.2. PCR

A segunda fase do método consiste numa amplificação do cDNA mediante PCR, utilizando como *primers* o mesmo H-T<sub>11</sub>M empregue na reacção de RT prévia e um segundo oligonucleótido curto de sequência arbitrária. O sistema utilizado inclui 8 oligonucleótidos diferentes, denominados H-AP1, H-AP2...H-AP8, que se empregam

em reacções separadas. Esta amplificação requer a utilização de um nucleótido marcado radioactivamente, com o fim de permitir visualizar as bandas, como adiante se descreve.

Cada reacção foi realizada num volume de 20  $\mu$ l, no que se combinaram os seguintes componentes: cDNA (2  $\mu$ l), *primer* H-T<sub>11</sub>M (0,2  $\mu$ M), *primer* H-AP (0,2  $\mu$ M, tampão de PCR 1X (20 mM Tris-HCL, pH 8,4, 25 mM KCl, 0,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,0005% gelatina), dNTPs (2  $\mu$ M), [<sup>35</sup>S] dATP $\alpha$ S (1000Ci/mmol), Taq DNA polimerase Amplitaq<sup>®</sup> (1 unidade). O termociclador foi programado para executar 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 40°C durante 2 minutos e 72°C durante 30 segundos, seguido de uma extensão final a 72°C durante 5 minutos.

### 3.3. Electroforese

A separação dos produtos gerados durante a PCR foi realizada mediante electroforese em géis verticais de poliacrilamida a 6%, em condições desnaturantes. Os géis foram preparados entre duas placas de vidro de 50 cm x 38 cm x 0,4 mm. Estas placas foram tratadas previamente, pelo lado que entra em contacto com o gel, com ácido clorídrico (3 M), etanol e clorofórmio. Uma das placas foi também tratada com um repelente à base de silano (Sigmacote, Sigma<sup>®</sup>), para facilitar a recuperação do gel depois da electroforese.

Cada electroforese foi realizada num volume de 100 ml de gel de poliacrilamida, com a seguinte composição: ureia 6M, concentrado de poliacrilamida Long Ranger<sup>®</sup> 6% e tampão TBE 1X (10,8 g de TRIS base, 5,5 g de ácido bórico, 0,744 g Na<sub>2</sub>EDTA). Depois de filtrar a mistura com um filtro de 0,45  $\mu$ m, o volume foi acertado com água milli-Q e adicionou-se persulfato amoníaco a 5% e TEMED a 0,7%. Após verter esta mistura entre as duas placas de vidro, foi empregue um pente de “dentes de tubarão” pela parte não dentada, invertendo-se depois da polimerização do gel, para formar os poços onde se carregaram as amostras. Como tampão de electroforese foi empregue TBE a 1X (Tris 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0).

Depois de uma pré-corrida de 30 minutos e de se eliminar os restos de ureia dos poços, carregou-se as amostras. A um volume de 3,5  $\mu$ l de cada PCR acrescentou-se 2  $\mu$ l de tampão de carga (xilencianol 0,09%, azul de bromofenol 0,09%, EDTA 10 mM, pH 8,0 numa solução de formamida 95%). Uma vez realizada a desnaturalização da

mistura a 85°C durante 2 minutos, carregou-se as amostras nos poços. A separação electroforética do DNA realizou-se durante um período de 5 horas a 60 W. Seguidamente, procedeu-se à recuperação do gel, utilizando papel de cromatografia 3 M (Whatman). Depois de cobrir o gel com uma lâmina de plástico, foi introduzido num secador de géis (Bio-Rad, Modelo 583), onde se manteve durante uma hora a 80°C.

### **3.4. Obtenção das bandas que se expressam de forma diferencial**

Depois de seco, o gel foi introduzido numa cassette, em contacto com uma película de auto-radiografia (Hyperfilm<sup>TM</sup>MP, Amersham). Previamente, praticaram-se várias punções atravessando o gel e a película para facilitar o posterior alinhamento. O filme permaneceu exposto durante pelo menos 48 horas, antes de ser revelado. As bandas candidatas foram identificadas mediante a utilização da função differential display do programa de computador Quantity One<sup>®</sup> (versión 4.4.1). Para localizar cada uma destas bandas no gel, foram feitas quatro punções através do filme, que limitaram a área desejada, cortada com um bisturi e colocada seguidamente num microtubo com 100 µl de água milli-Q para suspender o DNA. Depois de permanecer 10 minutos a temperatura ambiente, levou-se à ebulição durante 15 minutos, centrifugou-se para separar o DNA dos restos de gel e de papel e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo.

O DNA foi precipitado, depois de permanecer 30 minutos a -80°C, uma vez adicionados 10 µl de acetato de sódio 3M, 5 µl de glicogénio (10 mg/ml) e 450 µl de etanol 100%. Depois, foi centrifugado durante 10 minutos a 4°C. Após a eliminação do sobrenadante, o precipitado de DNA foi lavado com 200 µl de etanol a 85% refrigerado. Por último, o DNA foi suspenso em 10 µl de dH<sub>2</sub>O e congelado a -20°C até à sua utilização.

#### **3.4.1. Reamplificação do fragmento de cDNA**

Na reamplificação do fragmento de cDNA foi utilizado o mesmo conjunto de *primers* e as mesmas condições da primeira PCR (ver apartado 3.2 de material e métodos), embora se tenha utilizado uma maior concentração de dNTPs e de não se ter

empregado isótopos.

Foi preparado um volume final de reacção de 40  $\mu$ l, com a seguinte composição: cDNA (4  $\mu$ l), *primer* H-T<sub>11</sub>M (0,2  $\mu$ M), *primer* H-AP (0,2  $\mu$ M), tampão de PCR 1X, dNTPs (20  $\mu$ M) e Taq DNA polimerase (1 unidade). O termociclador executou o programa previamente descrito (ver apartado 3.2 de material e métodos) para a PCR, com excepção de que o tempo de extensão final foi de 7 minutos.

Para comprovar a eficácia da reamplificação, um volume de 30  $\mu$ l das amostras desta PCR foi carregado num gel de agarose 1,5% com 0,5  $\mu$ g/ml de brometo de etídio, em tampão TBE 1 X. Em cada poço foram carregados 35  $\mu$ l, correspondendo 30  $\mu$ l às amostras reamplificadas de cDNA e 5  $\mu$ l ao tampão de carga (ficol 1X).

Foram consideradas satisfatórias as reacções de reamplificação do fragmento de cDNA, em que se observou uma banda nítida superior a 150 bp (maiores do que o tampão de carga xilencianol). Os restantes 10  $\mu$ l das amostras foram congelados a -20°C.

### 3.4.2. Clonagem das bandas candidatas

A clonagem do fragmento (inserto) em *E. coli* (plasmídeo) tem por objectivo conservar de forma ilimitada o fragmento de interesse, isto é, a banda candidata que isolámos durante o desenrolar da experiência de expressão diferencial. A seguir se descreve os passos seguidos para a clonagem destes fragmentos.

#### 3.4.2.1. Ligação

Na realização do processo de clonagem utilizou-se o kit TOPO TA Cloning<sup>®</sup> (Invitrogen), que inclui um vector plasmídico preparado para a inserção directa de um produto de PCR amplificado mediante Taq polimerase. Este vector apresenta as seguintes características principais: genes de resistência aos antibióticos ampicilina e kanamicina; sequências de nucleótidos complementares aos *primers* universais M13 directo e reverso, flanqueando o sítio de ligação; extremos “T” coesivos, que permitem

a ligação de produtos de PCR aos extremos “A” coesivos, gerados durante uma reacção de PCR com Taq DNA polimerase.

Para a reacção de ligação preparou-se a seguinte mistura: 4 µl de produto de PCR, 1 µl de solução de sais (NaCl 1,2 M, MgCl<sub>2</sub> 0,06 M) e 1 µl de vector TOPO<sup>®</sup>. A reacção de ligação ocorreu mediante incubação da mistura a temperatura ambiente durante 5 minutos, transferindo-se posteriormente para gelo.

#### 3.4.2.2. Transformação

A transformação, isto é, a introdução do plásmido nas células bacterianas realizou-se mediante o método do choque térmico. Uma vez descongeladas as células competentes de *E. coli*, adicionaram-se 2 µl da mistura antes preparada e, após uma incubação em gelo durante 30 minutos, aplicou-se um choque térmico durante 30 segundos, a 42°C.

Seguidamente, adicionou-se às células 250 µl do meio SOC (2% triptona, extracto de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucose 20 mM) e manteve-se em agitação durante 1 hora a 37°C. As bactérias que incorporaram o plásmido expressam resistência ao antibiótico utilizado como marcador de selecção (Ampicilina). Nas placas de Petri com meio Luria-Bertoni (composição do meio LB para 1 litro: triptona 10 g, extracto de levedura 5 g, NaCl 10 g; ajustado pH a 7,0 com NaOH e esterilizado em autoclave, agar 2% e ampicilina 100 µg/ml) colocou-se 30 µl do cultivo anterior e, após incubar toda a noite a 37°C, escolheram-se 10 colónias para posterior análise.

Com o objectivo de comprovar a eficácia da clonagem a partir do cultivo de bactérias em meio líquido, foi analisada a presença do plásmido em cinco colónias eleitas ao acaso, realizando o protocolo da lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001), como a seguir se descreve.

Num primeiro passo, cultivaram-se as colónias escolhidas em 3 ml de LB/ampicilina (100 µg/µl). Um volume de 1,5 ml deste cultivo foi incubado toda a noite a 37°C com agitação (220 r.p.m.). Com o fim de recolher as bactérias, centrifugou-se o cultivo durante 5 minutos a 6 000 r.p.m., sendo depois o precipitado de bactérias suspenso em 100 µl de uma solução contendo glucose 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8,0

e EDTA 10 mM pH 8,0. Depois, adicionaram-se 200 µl da solução de lise (0,2 N NaOH, 1% SDS) para romper a membrana plasmática bacteriana. Após incubar 5 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 150 µl de solução de neutralização pré-arrefecida (acetato potássico 3M pH 5,8 e ácido acético glacial 7 M). Depois de incubar 10 minutos em gelo, centrifugou-se 10 minutos a 13 000 r.p.m.. O sobrenadante, contendo o DNA plasmídico, transferiu-se para um tubo novo e procedeu-se à precipitação do DNA adicionando 300 µl de isopropanol deixando permanecer 2 minutos à temperatura ambiente. De seguida realizou-se uma centrifugação durante 15 minutos a 13 000 r.p.m. para recuperar o precipitado de DNA. Este foi lavado com 100 µl de etanol 70% (v/v) e, após uma última centrifugação durante 5 minutos a 13 000 r.p.m., eliminou-se o sobrenadante. O DNA foi suspenso em 50 µl de tampão T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris 10mM pH 7,5, EDTA 1 mM) e armazenado para posterior utilização a -20°C.

Com a finalidade de confirmar se os plásmidos isolados continham o fragmento de interesse, realizámos uma PCR cujo objectivo é a amplificação do inserto a partir dos *primers* universais presentes no vector. Para tal, preparam-se 20 µl da seguinte mistura: DNA plasmídico (1 µl), *primer* M13 directo (0,1 µM), *primer* M13 reverso (0,1 µM), tampão de PCR 1X (10mM Tris-HCL, pH 8,3; 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% gelatina), dNTPs (20 µM) e Taq DNA polimerase (1 unidade). O termociclador foi programado para executar uma desnaturalização inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto, para finalizar com uma extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Depois foi realizada uma separação electroforética do produto amplificado em gel de agarose a 2%, para comprovar o êxito da clonagem. Posteriormente utilizaram-se os produtos de PCR que apresentaram uma banda do tamanho esperado.

Um cultivo das colónias foi armazenado a -20°C numa solução de (50% glicerol/LB), misturando em partes iguais colónia e mistura. O produto das PCR foi armazenado a -20°C para posterior utilização. Parte desse produto (10 ng) foi utilizado para a sequenciação.



#### 4. Sequenciação

A sequenciação foi realizada com a finalidade de conhecer a sequência de nucleótidos da banda candidata. Para tal optou-se pelo emprego do kit de sequenciação “ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit with AmpliTaq® DNA Polymerase”, que contém dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTPs) marcados com fluorocromos.

Na realização de sequenciação e de acordo com as recomendações do fabricante, foram realizadas duas reacções separadas: uma com o *primer* universal directo e outra com o reverso. Para tal fim foram preparadas duas reacções, cada uma com 10 ng da PCR de clonagem considerada válida (ver apartado 3.4.2.2 de material e métodos). A uma das reacções foi adicionada 6 µl da mistura com a seguinte composição: 1,5% de tampão de sequenciação a 5X (Kit), 2,5 µl do Kit BigDye™ Terminator, 0,32 µM de *primer* universal M13 directo. À outra foi acrescentada a mistura idêntica, mas empregando o *primer* universal M13 reverso, em vez do directo. O termociclador executou o seguinte programa: desnaturalização inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos de 96°C durante 30 segundos, 53°C durante 15 segundos e 60°C durante 4 minutos.

Depois foi realizada a purificação da cadeia de DNA para eliminar os excessos de *primers* e de dNTPs que impediram uma correcta leitura da sequência. Para a purificação foi adicionado ao produto obtido da reacção de PCR 27 µl da seguinte mistura: 1 µl de acetato sódico 3M (pH 4,6), 1 µl de EDTA 125 mM e 25 µl de etanol 95% não desnaturalizado. Depois de uma precipitação à temperatura ambiente durante 15 minutos, realizou-se uma centrifugação a 3 000 r.p.m. durante 40 minutos a 4°C e foi eliminado o sobrenadante. Depois de se adicionar 35 µl de etanol 70% em cada amostra centrifugou-se a 3 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C e eliminou-se o sobrenadante. Às amostras foram adicionadas 2,35 µl de tampão de carga (2 µl de formamida e 0,35 µl de azul dextrano). Para a realização da electroforese no gel de poliacrilamida desnaturalizaram-se as amostras a 94°C durante 5 minutos.

#### 4.1. Electroforese

A electroforese foi realizada no sequenciador automático ABI PRISM 377, para o qual se preparou 50 ml de gel de poliacrilamida, com a seguinte composição: ureia 7M, concentrado de poliacrilamida Long Ranger<sup>®</sup> 5%, tampão TBE 1X (TRIS base 10,8 g, ácido bórico 5,5 g, Na<sub>2</sub>EDTA 0,744 g). Depois de filtrada a mistura com um filtro de 0,45 µm, acertou-se com água milli-Q até obter o volume desejado e adicionou-se persulfato amónico a 5% e TEMED a 0,7%. Esta mistura foi vertida entre duas placas de vidro de 50 cm x 25 cm x 0,2 mm. Os dados recolhidos ao longo das 10 horas de electroforese a 48 W foram analisados de forma automática pelo software Sequencing Analysis (Version 3.7)

#### 5. Identificação das sequências (BLAST)

Depois de conhecer a sequência de nucleótidos da banda de cDNA, comprovou-se a identidade comparando-a com uma base pública de dados (NCBI-*National Center for Biotechnology*), utilizando uma ferramenta de alinhamentos de sequências, como BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide-Nucleotide*) utilizando como base de dados “Nucleotide collection (nr/nt)” e, quando não existiu homologia com sequências conhecidas também se procurou na base de “Expressed Sequence Tags (ESTs)”. A aplicação BLAST pode encontrar-se na web: <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>

## **6. Transferência de RNA (Northern Blot) e hibridação de sondas específicas**

Uma vez obtidas as bandas candidatas dos géis de DD, existem diferentes métodos para confirmar de forma independente a expressão diferencial do RNA. De todos, a análise Northern blot ou transferência de RNA é a técnica mais utilizada para confirmar se as bandas candidatas de cDNA isoladas de géis de differential display são “positivas” e se representam genes que se expressem de forma diferencial na experiência em estudo. A pesar de existirem muitas modificações da técnica original criada há 20 anos, os passos básicos são os seguintes: (i) extracção de RNA intacto; (ii) separação do RNA em géis de agarose desnaturantes; (iii) transferência do RNA para um suporte sólido (membrana); (iv) fixação do RNA ao suporte; (v) purificação da sonda; (vi) hibridação da membrana com sondas marcadas, complementares da sequência de interesse; (vii) lavagem das uniões não específicas da sonda; (viii) detecção, captura e análise em imagem do sinal desejado pela sonda sobre a membrana.

### **6.1. Extracção de RNA**

A extracção do RNA da glândula mamária realizou-se como antes foi descrito (ver apartado 2.2 de material e métodos).

### **6.2. Electroforese do RNA**

Na preparação de 100 ml de gel de agarose 1% misturaram-se 16 ml de formaldeído (37%), 10 ml de MOPS 10X (0,2 M de MOPS, 20 mM de acetato sódico, 10 mM de EDTA pH 8,0) e 24 ml de água DEPC (0,1%), obtendo-se assim metade do volume desejado. Por outra parte, levaram-se à ebulição 50 ml de água milli-Q com 1 g de agarose e, depois de se adicionar a mistura antes preparada, verteu-se no molde em que se realizou a electroforese.

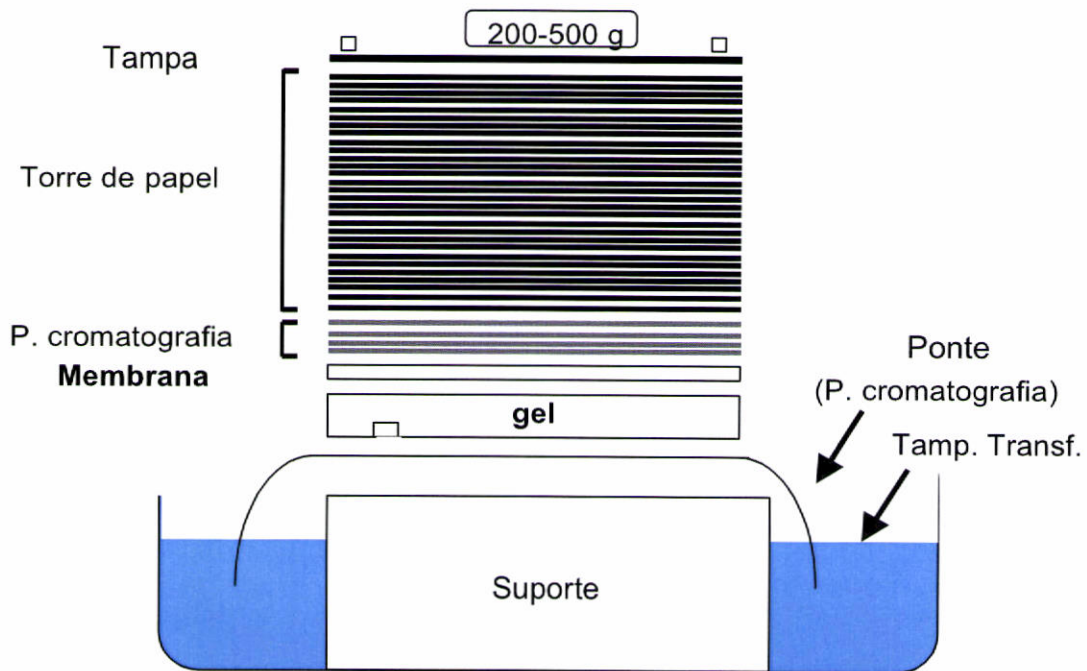
Para preparar as amostras diluíram-se 10 µg de RNA total em água DEPC, de modo que o volume final de cada amostra foi de 12 µl. A cada amostra adicionaram-se 25 µl do seguinte tampão de diluição: 12:25 (v/v) de formamida, 1,2X de MOPS, 5,92% de formaldeído, 0,8X de tampão de carga (0,8% de glicerol, 1,6 mM de EDTA, 0,04%

de azul de bromofenol, 0,04% de xilencianol) e 0,04 mg/ml de brometo de etídio. Depois de desnaturalizar as amostras a 65°C durante 10 minutos e de as colocar em gelo durante 2 minutos, foram carregadas no gel. Numa cuvete horizontal com MOPS 1X como tampão realizou-se a electroforese a 80 V até que o azul de bromofenol atingiu o final do gel. Imediatamente se lavou o gel com água DEPC e, depois de envolvê-lo com uma lâmina de plástico, fotografou-se com uma régua graduada, como referência.

### **6.3. Transferência e fixação do RNA desnaturalizado à membrana**

O método Northern blot consiste na transferência do RNA do gel de agarose para uma membrana, por acção capilar de um tampão de transferência. Para a realização desta transferência optou-se pela utilização de membranas de nylon carregadas positivamente.

Para a execução da transferência montou-se o preparado segundo o esquema (figura 12), adicionando-se os papéis um a um e eliminando as borbulhas de ar. Utilizou-se como tampão de transferência 10X SSC. Depois de permitir a transferência durante três horas e meia, desmontou-se a preparação, marcando a membrana com um lápis na posição dos poços antes de retirar o gel. Depois de lavada no tampão 2X SSC procedeu-se à fixação do RNA à membrana por “*crosslink*”.



**Figura 12.** Preparação montada para realização da transferência inversa de RNA

#### 6.4. Purificação da sonda

Para a realização do Northern blot a sonda de cDNA foi purificada com o kit “QIAquick PCR Purification Kit”, seguindo o protocolo do fabricante. Depois de realizada uma electroforese em gel de agarose da amostra a purificar, foi cortada do gel com um bisturi limpo. Num eppendorf foi adicionado três volumes do tampão QC (do kit) por volume de amostra e, após incubar a 50°C durante 10 minutos, para que se dissolvesse o gel, adicionou-se um volume de isopropanol por volume de amostra e misturou-se. Esta mistura foi adicionada a uma coluna de purificação QIAquick (do kit) e centrifugou-se (13 000 rpm) durante 1 minuto. Depois de eliminar o volume resultante da centrifugação do tubo colector da coluna adicionou-se 0,5 ml do tampão QC e centrifugou-se (13 000 rpm) durante 1 minuto. Voltou-se a eliminar o volume resultante da centrifugação, adicionou-se 0,75 ml de tampão PE (do kit) e após três minutos de incubação centrifugou-se (13 000 rpm) durante 1 minuto. Após expulsar de novo o volume resultante da centrifugação foi realizada uma centrifugação adicional durante 1

minuto, para eliminar qualquer vestígio de etanol residual. Foi substituído o tubo colector da coluna por um eppendorf de 1,5 ml e lavou-se o DNA purificado com 50  $\mu$ l de tampão EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) depois de uma última centrifugação durante 1 minuto.

### 6.5. Hibridação de RNA

Para a hibridação da membrana com a sonda marcada (banda candidata) complementar da sequência de interesse, foi utilizado o kit “Randon Prime Labelling System” “Redi Prime II” (Amersham). Para tal foi introduzida a membrana num tubo de hibridação que continha 50 ml de solução de pré-hibridação com a composição de 0,25 M de tampão fosfato (pH 7,2) e 7% de SDS e deixou-se pré-hibridar com agitação durante pelo menos duas horas a 65°C.

A sonda foi marcada com  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP, segundo o protocolo Rediprime II. Para a marcação diluíram-se 25 ng de DNA da sonda em 45  $\mu$ l de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (10 mM de Tris pH 8, 1 mM de EDTA) e, depois de uma desnaturalização durante 5 minutos, foi colocada em gelo durante 5 minutos. Depois de uma centrifugação, transferiu-se o conteúdo para um tubo de reacção (solução tampão com dATP, dGTP, dTTP, enzima Klenow e *primers* aleatórios) fornecido pelo kit. A partir deste momento, e dado que se empregaram produtos radioactivos, trabalhou-se com a protecção de um ecrã de metacrilato. Ao tubo de reacção foram adicionados 5  $\mu$ l de Redivue [<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham) e misturou-se, pipetando 12 vezes. Após uma incubação a 37°C durante 30 minutos, a reacção foi parada por adição de 5  $\mu$ l de EDTA 0,2M. A sonda foi purificada utilizando as colunas de purificação (Nick<sup>TM</sup> column), capazes de separar os nucleótidos que não estivessem bem marcados com <sup>32</sup>P. Para tal, depois de se lavar a coluna três vezes com o tampão T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>, permitindo, na última, que este entrasse na membrana de gel que contém a coluna, adicionou-se a sonda, purificada depois de se ter introduzido duas vezes tampão T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>, na coluna. Os primeiros 400  $\mu$ l foram descartados e a sonda purificada foi lavada com os seguintes 500  $\mu$ l de tampão. Deste volume, 5  $\mu$ l de sonda purificada foram utilizados para a contagem de centelheo e ao restante adicionou-se 50  $\mu$ l de NaOH 5 M para desnaturalizar a sonda. Depois de se eliminar os 50 ml da solução de pré-hibridação do tubo de hibridação foi adicionada a sonda purificada e desnaturalizada em

20 ml de uma nova solução de pré-hibridação pré-aquecida a 65°C. O tubo de hibridação que contém a membrana foi deixada no forno, hibridando com agitação a 65°C durante uma noite.

#### **6.6. Contagem de centelheo**

Na contagem da actividade da sonda marcada foram empregues 2 ml de líquido de centelheo (Ecoscint<sup>TM</sup>-A) e 5 µl de sonda purificada. Como controlo negativo foram utilizados, em vez da sonda, 5 µl de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>. A leitura realizou-se no contador de centelheo (Packard Liquid Scintillation Analyser, Tri-Carb 2900TR).

#### **6.7. Lavagem e fixação da membrana**

Com o objectivo de eliminar o excesso de sonda unida inespecificamente à membrana, foi realizada uma lavagem rápida com a solução (tampão fosfatos 20 mM, SDS 5%), seguida de duas lavagens com a mesma solução mas durante 10 minutos a 65°C com agitação. Lavou-se também a membrana duas vezes com a solução (tampão fosfatos 20 mM, SDS 1%), durante 10 minutos a 65°C com agitação. As lavagens foram interrompidas quando o sinal radioactivo foi da intensidade desejada.

### 6.8. Detecção e análises do resultado da hibridação

A imagem da distribuição da sonda ligada à membrana foi obtida por fosfo-imagem (“FLA-5000 de FUJIFILM v3.0”) e por auto-radiografia.

Depois de envolver a membrana numa lâmina de plástico, esta foi introduzida numa cassette com a membrana de fosfo-imagem e deixada em repouso durante um período de 7 horas à temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo, a membrana foi lida no aparelho “FLA-5000 de FUJIFILM” e a imagem analisada no programa de computador “Image Reader FLA-5000 v3.0”. Para a obtenção da imagem por auto-radiografia foi introduzida a membrana numa cassette prevista de ecrãs intensificadores, com um filme de auto-radiografia (Hyperfilm<sup>TM</sup>MP, Amersham) e manteve-se a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante pelo menos um período de 48 horas, para ser revelada depois.

### 6.9. Revelação da película de auto-radiografia

Para se revelar a película de auto-radiografia, foi introduzida no revelador (Kodak AI-4) durante 1 minuto, após o que foi lavada em água em igual período de tempo e deixada no líquido fixador (Kodak AI-4) durante 5 minutos. Depois de se lavar a membrana, passou-se o filme por água milli-Q e deixou-se secar.

### 6.10. Quantificação dos resultados de hibridação Northern blot

Os resultados da hibridação Northern podem ser desviados pelas diferenças de RNA total carregado nos poços dos géis de agarose-formaldeído utilizados em Northern blot. Para corrigir este possível erro, tentou-se em primeiro lugar normalizar os resultados de hibridação dos genes em que se observou expressão diferencial, com uma sonda de  $\beta$ -actina. Uma vez que a expressão dos genes “*housekeeping*” é afectada pela lactação, a sonda de  $\beta$ -actina não pode ser utilizada para normalizar o RNA total carregado. Por isso, no nosso estudo a quantidade de RNA foi normalizada pela banda de 28S rRNA visualizada nos géis de agarose-formaldeído e os resultados de hibridação dos genes (sondas) com expressão diferencial nos três grupos de animais em estudo apresentam-se em quantidades normalizadas para esta banda. Para a normalização



utilizou-se o programa computador Quantity One<sup>®</sup> (versão 4.4.1).

Para a comparação de médias entre os diferentes grupos utilizámos uma prova t-student, com variações iguais para as amostras.

### 6.11 Sonda $\beta$ -actina

A sonda de  $\beta$ -actina utilizada em Northern blot para normalizar os resultados foi obtida após se realizar uma reacção de retrotranscrição (RT) partindo de RNA total de glândula mamária de ovelha. Para tal utilizou-se o kit “SuperScript<sup>™</sup> First Strand Synthesis System for RT-PCR, de Invitrogen”.

Seguindo o protocolo do fabricante, combinou-se num eppendorf um volume final de 10  $\mu$ l com a seguinte composição: RNA total (5  $\mu$ g), *primer* oligo(dT)<sub>20</sub> (50  $\mu$ M); dNTPs (10 mM) e água tratada com DEPC, até atingir o volume final. Noutro eppendorf misturaram-se 10  $\mu$ l, como se indica: tampão RT 2X, MgCl<sub>2</sub> (10 mM), DTT (0,02 mM), RnasaOut<sup>™</sup> (40 U) e SupperScript<sup>™</sup>III RT (200U). Com excepção do RNA todos os reactivos utilizados foram fornecidos pelo kit.

Após misturar o conteúdo dos dois eppendorf incubou-se a 50°C durante 50 minutos e a 85°C durante 5 minutos e colocou-se em gelo. Depois de uma breve centrifugação para recolher a condensação adicionou-se 1  $\mu$ l de RNase H a cada tubo e incubou-se a 37°C durante 20 minutos. Parte do cDNA assim obtido foi utilizado para a reacção de PCR com os *primers* de  $\beta$ -actina e o restante foi armazenado a -20°C.

Os *primers* utilizados foram designados por ACTb-UP (AAGGCCAAC CGTGAGAAGATGACC) e ACT-DN (TTGAAGGTGGTCTCGTGAATGCCG).

A reacção de PCR realizou-se num volume de 20  $\mu$ l com a seguinte composição: RNA (4  $\mu$ g), ACTb-UP (10  $\mu$ M), ACT-DN (10  $\mu$ M), tampão de PCR 1X, dNTPs (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (50 mM) Taq DNA polimerase (1 unidade- “Biotools”). Como controlo positivo utilizou-se DNA de ovelha e como controlo negativo, água. O termociclador executou uma desnaturalização a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 40 segundos e 72°C durante 40 segundos e, por último, uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Esta sonda também foi purificada segundo descrito no apartado 7.1.4 de material e métodos.

Para controlar a especificidade das bandas candidatas em glândula mamária foi utilizado nos Northern blot RNA proveniente de fibroblastos fetais de ovinos, gentilmente cedido pelo Instituto de Desenvolvimento Agrário da Universidade de León.

#### **6.12. Recuperação da membrana (*Stripping*)**

Finalizada a análise dos resultados de hibridação, a sonda pôde ser retirada da membrana (*stripping*), para reutilização. Para a realização do *stripping* manteve-se em agitação a membrana durante 3 minutos com um litro de solução SDS (1%) em ebulição. Depois de se repetir a operação confirmou-se a eliminação da radioactividade, passando o monitor de contaminação de radioactividade pela membrana.

A membrana foi conservada para posterior utilização a  $-20^{\circ}\text{C}$ , envolvida numa lâmina de plástico a fim de evitar a sua desidratação.

### C. GenHunter

Tal como antes se fez referência, foi enviado para o laboratório GenHunter o RNA total extraído da glândula mamária de todos os animais em estudo (2.2 de Material e métodos). Nesse laboratório foram realizados géis de DD com a combinação de 24 *primers*. Em GenHunter, foram separadas dos géis as bandas candidatas e, depois de sequenciadas e de, clonadas foram-nos enviadas placas de petri com bactérias transformadas com o cDNA das bandas candidatas. No laboratório da ULE obteve-se o cDNA de interesse, como se descreve a seguir. Também aqui se realizou a comprovação de forma independente à expressão diferencial do RNA com a técnica de Northern blot. Por outro lado, foram-nos nos enviadas as sequências das bandas candidatas.

#### 1. Obtenção do cDNA das bandas candidatas de colónias enviadas por GenHunter

Do laboratório de GenHunter foram-nos enviadas placas de petri com colónias de bactérias transformadas com o cDNA das bandas candidatas cortadas dos géis DD. No laboratório de ULE, escolheram-se ao acaso duas colónias por cada inserção e depois, seguindo o protocolo de “PCR-TRAP<sup>®</sup> Cloning System de GenHunter”, cultivaram-se as bactérias em 5 ml de LB, dos quais se utilizou um volume de 3 ml para realizar o protocolo antes descrito (3.4.2.2 de material e métodos) de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) para obter o DNA plasmídico com a inserção desejada.

Para confirmar se os plasmidos isolados continham o fragmento de DNA da banda candidata foi realizada uma PCR utilizando os *primers* presentes no vector e que nos foram providos pelo laboratório de GenHunter. Como recomenda o protocolo do fabricante, foi efectuada a seguinte mistura com o volume final de 20 µl: DNA plasmídico (1µl), *primer rgh* directo (0,1 µM), *primer rgh* reverso (0,1 µM), tampão de PCR 1X (10mM Tris-HCL, pH 8,3; 50 mM KCl, 2,5 mM Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,01% gelatina), dNTPs (20 µM) e Taq DNA polimerase (1 unidade). O termociclador foi programado para executar 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 40 segundos e 72°C durante 1 minuto, para finalizar com uma extensão final a 72°C durante 7 minutos.

Depois realizou-se uma separação electroforética do produto amplificado em gel de agarose a 2%. O marcador de peso molecular também foi utilizado para quantificar a amostra (EcoLadder I - Ecogen). Foram utilizados posteriormente os produtos de PCR que apresentaram uma banda do tamanho esperado.

Um cultivo das colónias foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  numa solução de (50% glicerol/ LB) misturada em partes iguais. O produto das PCR foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização como sonda de hibridação na técnica de Northern blot.

## **2. Identificação das sequências (BLAST)**

Do laboratório de GenHunter foi enviada a sequência das bandas candidatas detectadas. Com elas se comprovou as identidades, comparando-as com uma base pública de dados (NCBI), utilizando uma ferramenta de alinhamentos de sequências como BLASTN, tal como se detalha no apartado 5 de material e métodos.

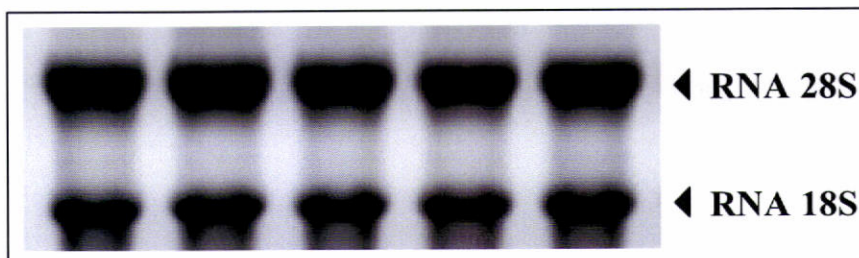


## V. RESULTADOS

### 1. Estimativa da concentração, grau de pureza e integridade do RNA

Embora com uma certa heterogeneidade, a concentração do RNA total extraído da glândula mamária de ovelhas de raça Churra, depois da eliminação do DNA contaminante, foi em média de 1,44  $\mu\text{g/g}$  de tecido.

Uma vez que a estimativa resultante da leitura de absorvência ( $A_{260/280}$ ) foi sempre próxima de 1,8, verificou-se que o RNA total depois do tratamento com a enzima DNase I (RNA total “limpo”) não se encontrava contaminado com proteínas. Além disso, a electroforese em gel de agarose das amostras de RNA total “limpo” (figura 13), permitiu observar as bandas de rRNA 28S e 18S. Uma vez que as bandas de rRNA 28S apresentaram aproximadamente o dobro da intensidade das bandas de 18S, foi confirmada a boa qualidade das amostras.



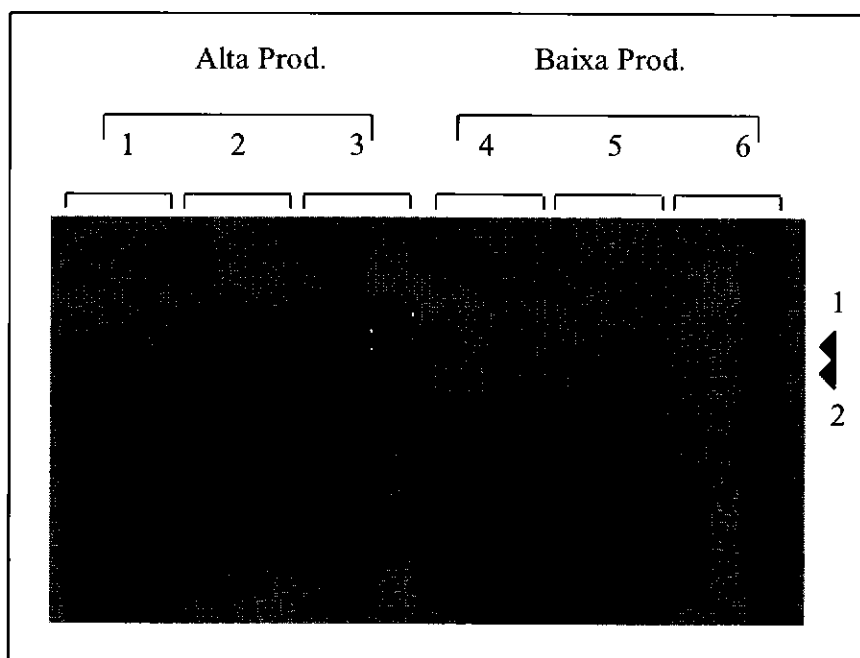
**Figura 13.** Integridade do RNA total.

#### **A. Géis de differential display realizados na Universidade de León. Obtenção do cDNA das bandas candidatas, clonação e sequenciação. Identificação das sequências (BLAST)**

Na Universidade de León (ULE), tal como se fez referência no capítulo 3 de material e métodos, realizou-se a técnica de DD partindo de tecido de glândula mamária de seis ovelhas de raça Churra, três de elevado nível de produção láctea e igual número de baixa produção. Para isso, tal como recomendam alguns autores, realizou-se a extracção de RNA total do úbere de todos os animais em triplicado e de forma

independente. As reacções da transcriptase reversa e de PCR necessárias na técnica DD realizaram-se a partir destas três extracções independentes de RNA. A electroforese das amostras foi realizada em triplicado.

A análise das auto-radiografias dos géis de poliacrilamida desnaturalizante permitiu observar uma média de 58 bandas de cDNA por carril. Com o programa de computador Quantity One<sup>®</sup> (versão 4.4.1) identificaram-se sete bandas candidatas para a expressão diferencial entre ovelhas de elevada e de baixa produção láctea (figura 14). Todas as bandas observadas parecem manifestar uma regulação positiva quando os animais produzem maior quantidade de leite.



**Figura 14.** Gel de DD com bandas candidatas (1 e 2) para a expressão diferencial em glândula mamária de ovelhas de elevada e de baixa produção de leite. Três ovelhas de elevada produção em triplicado e igual número de baixa produção.

A banda candidata 1 (figura 14) observa-se com maior intensidade nos animais de elevada produção, comparativamente com os de baixa produção. Esta, tal como as outras bandas candidatas para a expressão diferencial, foi extirpada dos géis de DD, enquanto o cDNA foi precipitado e, depois de reamplificado por PCR, clonado em *E. coli* (figura 15). A sequenciação dos fragmentos de cDNA permitiu conhecer a sequência de nucleótidos e o seu comprimento (tabelas 2 e 3). A banda candidata 1

apresenta um comprimento de 150 bp, sendo esta uma das menores obtidas na ULE. Utilizando as sequências de nucleótidos das bandas candidatas realizou-se um alinhamento com a base de sequências públicas, utilizando o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para determinar se a sequência de nucleótidos das nossas bandas apresentam homologia com algum gene ou sequência previamente identificados (tabela 2). Desta forma soube-se que a sequência da banda candidata 1 (150 bp) é unicamente homóloga em 54 bp com o segmento genómico de 433 kb de porco (*Sus scrofa*), que se localiza entre o não clássico e o clássico *cluster* do gene SLA classe I. Embora a banda 1 pareça ser uma candidata para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de elevada e de baixa produção láctea, não se realizou a comprovação pela técnica de Northern blot, que nos permitiria afirmar que este segmento se expressa mais no úbere de ovelhas que produzem maior quantidade de leite.



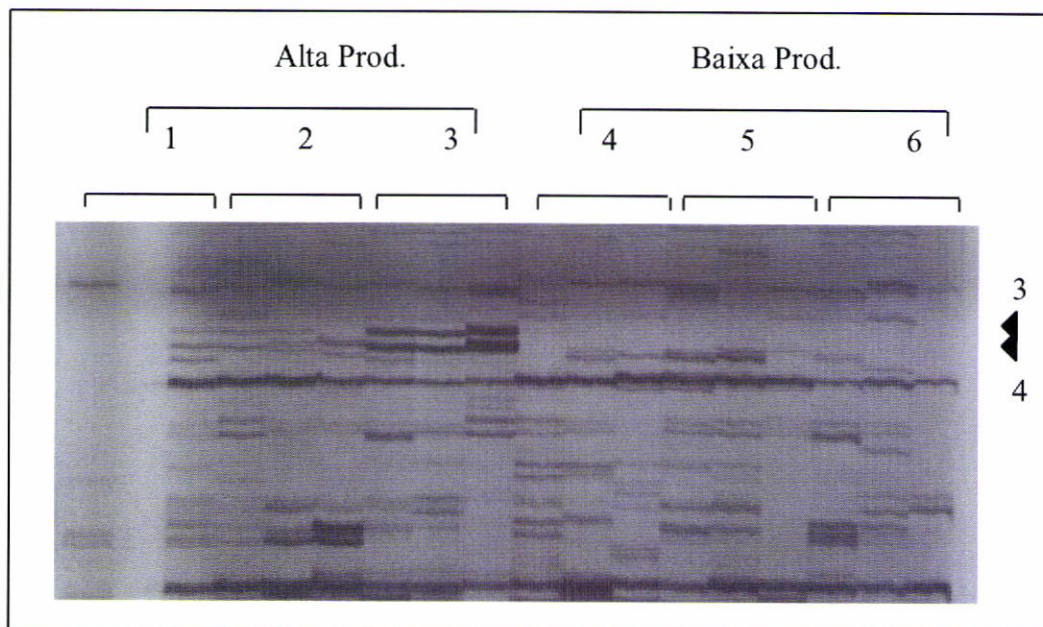
**Figura 15.** Colónias de *E. coli* com inserções de bandas candidatas

Também é possível visualizar no mesmo gel (figura 14) que a banda candidata 2 apresenta maior intensidade nos animais de elevada produção, face às outras ovelhas em estudo, embora seja também possível visualizá-la com pouca intensidade neste grupo de animais. Após a clonagem, a sequenciação da banda candidata 2 (150 bp) (tabela 3) e a realização do BLAST (tabela 2) foi observado que um total de 126 bp da nossa banda apresentou homologia com 129 bp da sequência de mRNA que se prevê similar à



tubulina,  $\beta$  5, (LOC615087) em vaca (*Bos taurus*) (tabela 2). Não se realizou a técnica de Northern blot, o que não permitiu confirmar a expressão diferencial desta banda candidata entre a glândula mamária de ovelhas de elevada e de baixa produção de leite.

As bandas candidatas 3 e 4 (figura 16) parecem mais nítidas nas ovelhas de elevada produção, face às de baixa produção. No entanto, é importante referir que não se observou nas três réplicas do animal 1, uma vez que no primeiro e no segundo carris não se verificou a amplificação destas bandas candidatas. A sequenciação permitiu observar que as bandas candidatas são complementares uma da outra (tabela 2). O BLAST destas bandas (295 bp) definiu uma homologia de apenas 24 bp com a sequência de DNA do cromossoma 14 do homem (*Homo sapiens*) da BAC R-433J8 da livraria RPCI-11. Também não se confirmou a expressão diferencial das bandas de cDNA, uma vez que não se realizou a técnica de Northern blot.



**Figura 16.** Gel de DD com bandas (3 e 4) para expressão diferencial em glândula mamária de ovelhas de elevada e de baixa produção de leite. Três ovelhas de elevada produção em triplicado e igual número de baixa produção.

As restantes três bandas candidatas – 5, 6 e 7 – identificadas nas autoradiografias dos géis de DD também apresentaram maior intensidade nas ovelhas de elevada produção face às de baixa produção. A sequência de nucleótidos destas bandas

pode observar-se na tabela 3. A banda 5 – a mais comprida obtida na ULE (366 bp) – apresentou uma homologia em 342 bp com o mRNA de  $\beta$ -caseína de ovelha, enquanto a banda 6 (357 bp) foi unicamente homóloga com 24 bp da sequência completa do clone RP11-351M16 do cromossoma 10 do homem (tabela 2).

Por seu lado, a banda candidata 7 (342 bp) apresentou homologia com 310 bp do mRNA do homodomínio da proteína IRXA2 (IRX2) do homem (tabela 2). Tal como antes, não se confirmou se estas bandas candidatas se expressam de forma diferencial na glândula mamária das ovelhas que produzem maior quantidade de leite face às que produzem menor quantidade.

A decisão de não confirmar a expressão diferencial das bandas candidatas obtidas no laboratório da ULE foi tomada depois da realização da técnica de Northern blot com as bandas candidatas obtidas a partir dos géis de DD realizados por GenHunter, uma vez que (adiantando alguns resultados) não se obteve diferenças significativas de expressão entre animais dos dois grupos de produção de leite (elevada e baixa).

Uma vez que nos pareceu que os géis de diferencial display realizados no laboratório da ULE apresentaram poucas bandas candidatas para a expressão diferencial entre estes dois grupos de animais, decidimos amplificar o grupo incluindo no estudo três ovelhas adultas, na fase não produtora de leite (secas). Para maior segurança nos resultados, optámos por enviar o RNA total extraído da glândula mamária de todos os animais para o laboratório de GenHunter.

**Tabela 2.** Bandas candidatas para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de elevada e de baixa produção de leite (ULE). Banda candidata (número), comprimento (bp), sequência homóloga à da nossa banda (BLAST), percentagem de identidade entre a sequência da banda candidata e a homóloga. Localização no cromossoma da sequência homóloga.

<b>Banda Candidata</b>	<b>Compr. (bp)</b>	<b>Sequência Homóloga (BLAST)</b>	<b>Identid. (%)</b>	<b>Localiz. Cromos.</b>
1	150	clone: BAC 1051H9 do segmento genómico de 433 kb, localizado entre o não clássico e o clássico SLA classe I em <i>Sus scrofa</i>	54/55 (98%)	
2	150	Previsão do mRNA similar à tubulina, $\beta$ 5, variação 5 na transcrição, (LOC615087) em <i>Bos taurus</i>	126/129 (97%)	BTA-23
3	295	Sequência completa da BAC R-433J8 da livraria RPCI-11 do cromossoma 14 de <i>Homo sapiens</i>	24/24 (100%)	BTA-14
4		Igual à anterior (complementar)		
5	366	mRNA de $\beta$ -caseína de ovelha	342/342 (100%)	OAR-6q22-31 BTA-6q31-33 HSA-4q21,1 SSC-8 MMU-5 (44,91cM) RNO-14p21
6	357	Sequência completa do clone RP11-351M16 no cromossoma 10 de <i>Homo sapiens</i>	24/25 (96%)	HSA-10
7	342	mRNA do homodomínio da proteína IRXA2 (IRX2) em <i>Homo sapiens</i>	310/320 (96%)	HSA-5p15,33 GGA-2



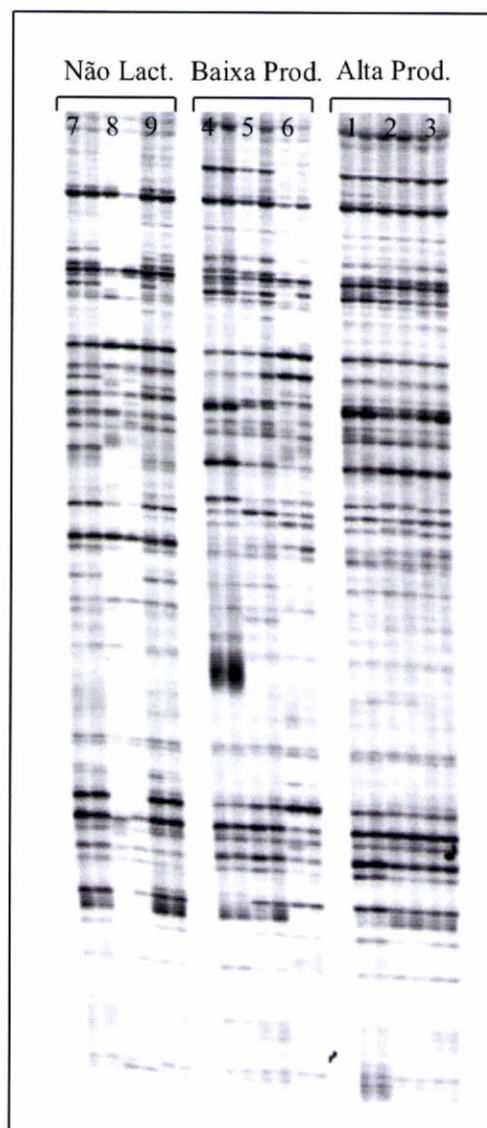
Tabela 3. Sequência de nucleótidos das bandas candidatas (ULE)

Banda Candidata	Sequência de Nucleótidos
1	AAATTTTTTCGAATTCAACAAACAACAAATGCTTATGTAGAGCCTATAGATACTCAGCTAAA GCTGTAGATGGAAGAGAAGAAAATGACACTTGAAAACCGACAGAAAATGCAAATTTCTGAGGG AGAGGTTAGGGGTCGTGTACAAGCTT
2	AAGCTTCTCAACGACCCCTTTCCCTCCCTCAGAATTTGCATTTTCTGCCTCTATCTTGT TTCTTTTTTGGGGGGGATTCTAGAACAGTGCCTGGTACATAATAGGCGNTCAATAAATATTT GTTGTTTGTGAAAAAAAAAAAAAGCTT
3	AAGCTTTGGTCAGAGGAGACAAGAGTTCATGTAATAGTTGAGTAGCCATAACGTGACCCTA ACATTTCACTATTACAGGCAATATGAGTACTGCTTCCCTCCATGTCTGACGGTTTCAACAG TGGGAAACGACAATCCAAAACCTACAAGAAAAACGTGTGAAGAGATACCATCTCCCTCAAAAG ACTGGGAAGGACACAACCTGACAGCATCTGATCCTTCTCCTCTGAAGGAAAGAACGGCCATGT CCTGCCCTCAGTCCCCTTAAACCACNGCCTAAAAAAAAAAAAAGCTT
4	Sequência complementar à anterior
5	AAGCTTGATTGCCCCCTCCTCACTTTTGAATTGACTGCGACTGGAAAATATGGCAACTTTTCA ATCCTTGATCATGCTACTAAGATAATTTTAAATGAGTATACATGGAAACAAAAAATGAAAC TTTATTCCTTTATTTATTTTATGCTTTTTTCATCTTAATTTGAATTTGAGTCATAAACCATAT ACTTTCAAAATGTTAATTCACATTTAGCATAAAAGTTTCAAGTTTAACTTGAAAATATCATGA ACATATCAAAATATGTATAAAAAATAATTTCTGGAATTGTGATTATTTATTTCTTTAAGAATCT ATTTCCCTAACCGTCATTTCAATAAATTAACCCCTTAGGCATAAAAAAAAAAAAAAGCTT
6	AAGCTTTTTTTTTTTTATCAAGCCACAGTTACTGGAATAATCCCAATTATCAAAAACAAGTCC TATTAGCCCCAATGCCAGACCAAGTACAAAGTTTCCAGCTGTAATAAGGGCAAAGTCCCCAC CAAAGACTAATAAGGCAACGACACTATAACAACCTTTTGCAACGAACCGAAAAATCAATATTT GGTGCTCCTTTACCAGCTAACTGTCTTTGCAAAACCCATGATAGCAGAAACAAGCACAAAGTCC AACTATAGCCAGTGGCATCCCAATAGAAGCCATCCCCCAATCTGGCAAGGTATAAAAAACACA TTCCTAATGCCAAGACTAATAAACTAACGGTATAGGCAATCAAGCTT
7	AAGCTTTTTTTTTTTTAGACTAGTTTGTTTTTTATTTACAATTTAAGATATAAATTAGTAAAGA ATTCCTGTTAAACAACCAACAAAGATTGTATAACCAGCAATGTTCAAATAAAAACCAGGCAG AATTTATTTACAAAAGGTTTAGATTCCATTGCAATACAACCTTGCAATAAATTAAGTAAAGCTT TATATCATTATAAGAATAAATATCAAATTTGTTTCCACTTCTTAAGTACTCAAGTCTATAA TCAGTTTTCATTTCTACTGTGTACATCTTTTACAAATAAATTTTACAGTAAATCCTATCACA CCTATAGAATATATACCGTGGCAATCAAGCTT

**B. Géis de differential display realizados em GenHunter. Obtenção do cDNA das bandas candidatas, a partir de colónias de bactérias transformadas. Identificação das seqüências (BLAST). Confirmação da expressão diferencial (Northern Blot)**

Tal como antes se referiu, foi enviado para o laboratório GenHunter RNA total extraído da glândula mamária dos nove animais em estudo. Nesse laboratório foram realizados géis de DD e à ULE foi enviada a digitalização das auto-radiografias dos géis. Nestas digitalizações foi possível contemplar uma média de 60 bandas por carril (figura 17). Também se pode observar na figura 17 que todas as amostras foram realizadas em duplicado.

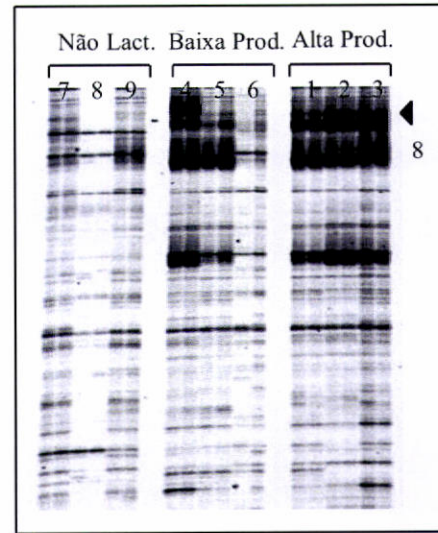
Estes géis permitiram a observação nítida de 21 bandas candidatas para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de elevada produção de leite, de baixa produção e não lactentes.



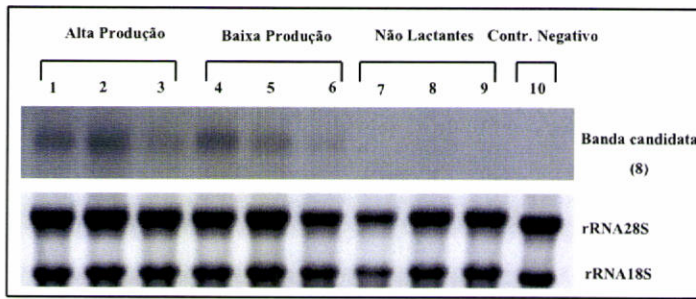
**Figura 17.** Gel de DD com bandas candidatas para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de elevada produção de leite, de baixa produção e não lactentes. Três ovelhas de elevada produção em duplicado, igual número de baixa produção e de não-lactentes.



Tal como se pode observar na figura 18, a banda candidata 8 é muito intensa nos animais de alta produção de leite e no animal 4 de baixa produção, reduzindo ligeiramente a intensidade na ovelha 5 deste grupo de animais e praticamente não se observando na ovelha 6. Nas ovelhas secas esta banda está ausente ou visualiza-se com pouca intensidade comparativamente aos animais de elevada produção de leite. Esta banda de 431 bp alinha com 289 do mRNA codificado pelo gene da glicerol-3-fosfato aciltransferase mitocondrial (GPAM) de *Bos Taurus*. O gene da GPAM localiza-se no cromossoma 26 da vaca, no cromossoma 10q25,2 no homem, também se observa no cromossoma 10 de trogloditas (*Pan trogloditas*) e se encontra no rato no cromossoma 19 à distância de 52,0 cM, enquanto na ratazana foi encontrado no cromossoma 1q55 (tabelas 4 e 5). A técnica de Northern blot permite determinar a expressão diferencial do mRNA de forma semiquantitativa, comparando a densitometria do sinal da sonda a analisar e a de um controlo que, no nosso estudo, foi a intensidade da banda de rRNA 28S resultante da coloração do gel de agarose-formaldeído. Obteve-se o sinal da sonda 8 com a técnica de Northern blot nos animais produtores de leite face aos animais secos (figuras 19 e 20). O sinal foi mais intenso nas ovelhas 1 e 2 de elevada produção e no animal 4 de baixa produção. A comparação da intensidade do sinal de hibridação não permitiu detectar diferenças significativas entre os dois grupos produtores de leite. Não se observou hibridação com o controlo negativo de fibroblastos fetais de ovelha.

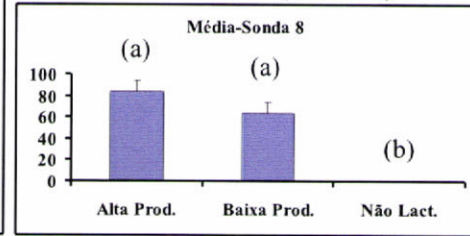


**Figura 18.** Gel de DD com banda candidata (8) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



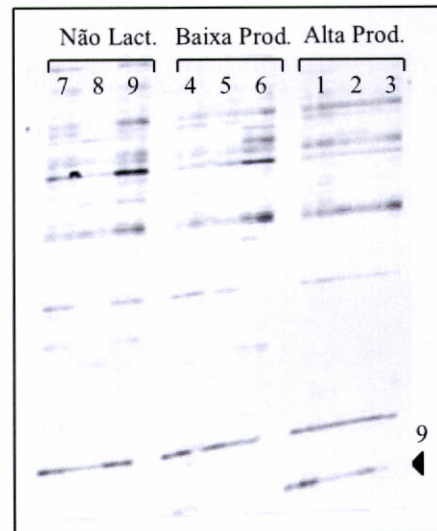
**Figura 19.** Membrana Northern blot hibridada com a sonda (8). Gel de agarose com rRNA. Ovelhas de elevada produção (n=3), baixa produção (n=3) e não lactentes (n=3). Controlo negativo com fibroblastos fetais de ovelha.

**Glicerol-3-fosfato aciltransferase mitocondrial (GPAM)**

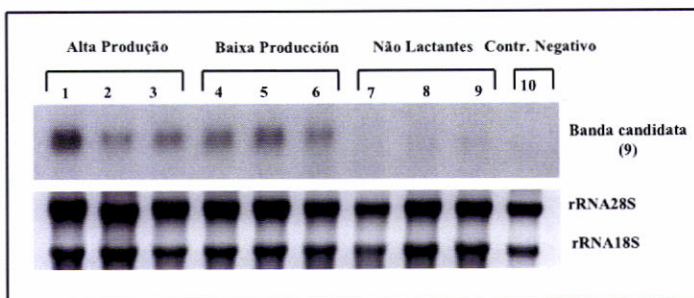


**Figura 20.** Valores médios ( $\pm$  erro padrão) da densitometria do sinal de Northern blot, sonda 8. A densidade foi normalizada para a banda de rRNA 28S. ((a) e (b) significativamente diferentes  $p < 0,05$ ).

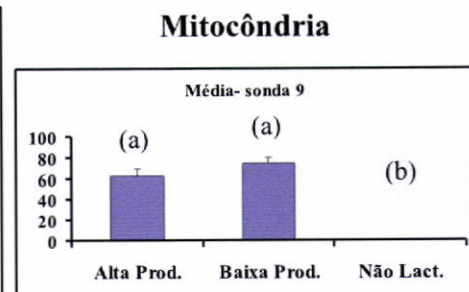
Na figura 21 unicamente se observa a banda candidata 9 nos animais de elevada produção, e com pouca intensidade no animal 4 do grupo de baixa produção. A sequência da banda (140 bp) é homóloga a 117 bp do genoma completo da mitocôndria de ovelha (*Ovis aries*), concretamente a parte da sequência que codifica a subunidade 5 da NADH desidrogenase (tabelas 4 e 5). A comprovação da expressão diferencial da banda, por Northern blot, permitiu observar que a subunidade 5 da NADH desidrogenase praticamente não se expressa em animais secos, mas não se observa diferenças significativas entre os animais de elevada e de baixa produção de leite, como seria de esperar pela técnica de DD (figuras 22 e 23). A sonda não hibridou com fibroblastos fetais de ovelha utilizados como controlo negativo.



**Figura 21.** Gel de DD com banda candidata (9) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



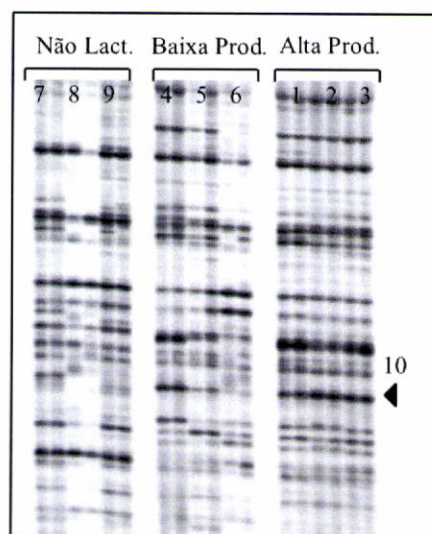
**Figura 22.** Membrana Northern blot hibridada com a sonda (9). Gel de agarose com rRNA. Ovelhas de elevada produção (n=3), baixa produção (n=3) e não lactentes (n=3). Controlo negativo com fibroblastos fetais de ovelha.



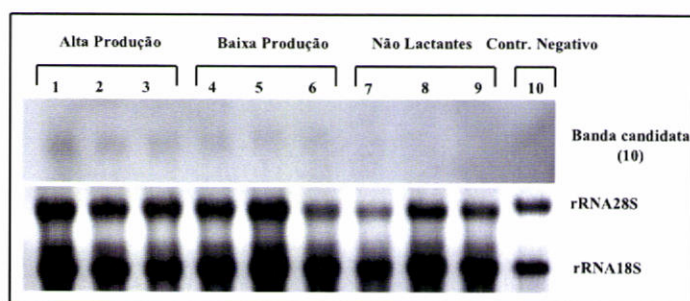
**Figura 23.** Valores médios ( $\pm$  erro padrão) da densitometria do sinal de Northern blot, sonda 9. A densidade foi normalizada para a banda de rRNA 28S. ((a) e (b) significativamente diferentes  $p < 0,05$ ).



O gel de DD permite também observar a banda candidata 10 (figura 24), que se percebe com nitidez nas ovelhas de elevada produção de leite e nos animais 4 e 5 do grupo de baixa produção. Nos restantes animais não se visualiza de forma nítida esta banda. A banda de 276 bp é homóloga em 247 bp à previsão do mRNA parcial similar do domínio de tetramerização 3 do canal de potássio (LOC505221) em *Bos taurus* (tabelas 4 e 5). O sinal de hibridação desta banda candidata, obtido com a técnica de Northern blot, é débil, mas percebe-se uma maior intensidade nos animais produtores de leite, face a não produtores, não se conseguindo, no entanto, observar expressão diferencial entre as ovelhas de elevada e de baixa produção (figuras 25 e 26). Não foi observado sinal de hibridação no carril correspondente ao controlo negativo.

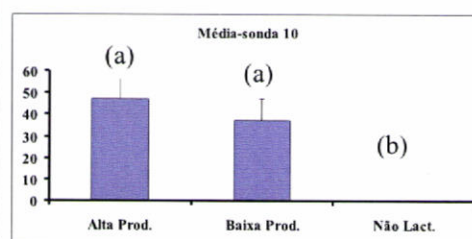


**Figura 24.** Gel de DD com banda candidata (10) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



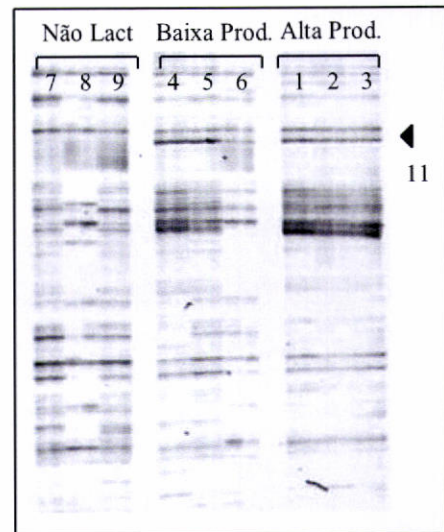
**Figura 25.** Membrana Northern blot hibridada com a sonda (10). Gel de agarose com rRNA. Ovelhas de elevada produção (n=3), baixa produção (n=3) e não lactentes (n=3). Controlo negativo com fibroblastos fetais de ovelha.

### Canal de potássio

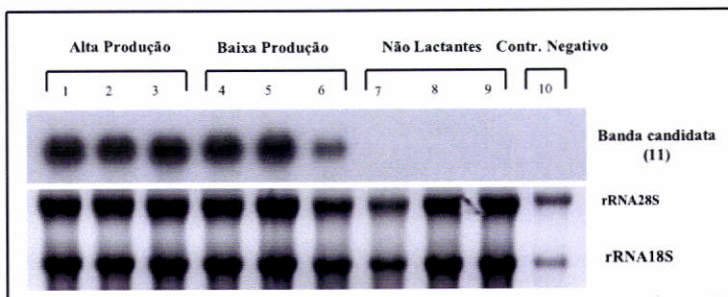


**Figura 26.** Valores médios ( $\pm$  erro padrão) da densitometria do sinal de Northern blot, sonda 10. A densidade foi normalizada para a banda de rRNA 28S. ((a) e (b) significativamente diferentes  $p < 0,05$ ).

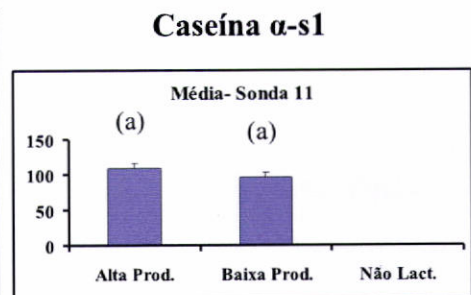
Na figura 27, pode-se analisar com nitidez a banda 11 nas ovelhas produtoras de leite, parecendo apresentar menor intensidade no animal 6 de baixa produção. Por seu lado, não se observou nas ovelhas secas. Esta banda, com uma sequência de 280 bp, alinhou com 261 bp do mRNA codificado pelo gene da caseína- $\alpha$ -s1 da ovelha (*Ovis aries*). Este gene foi localizado no cromossoma 6 da ovelha, no cromossoma 6q26-33 dos bovinos (*Bos taurus*) e no homem (*Homo sapiens*) no cromossoma 4q21,1. No porco foi observado no cromossoma 8 e nos ratos (*Mus musculus*) no cromossoma 5, à distância de 44,94 cM, enquanto nas ratazanas (*Rattus norvegicus*) se observa no cromossoma 14p21 (tabelas 4 e 5). A técnica de Northern blot confirmou os resultados obtidos por DD, isto é, o mRNA do gene da caseína- $\alpha$ -s1 expressa-se na glândula mamária de ovelhas produtoras de leite, enquanto não se observa em animais secos nem em fibroblastos fetais (controle negativo) (figuras 28 e 29). Não se observou diferenças significativas entre os dois grupos de ovelhas produtoras de leite.



**Figura 27.** Gel de DD com banda candidata (11) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.

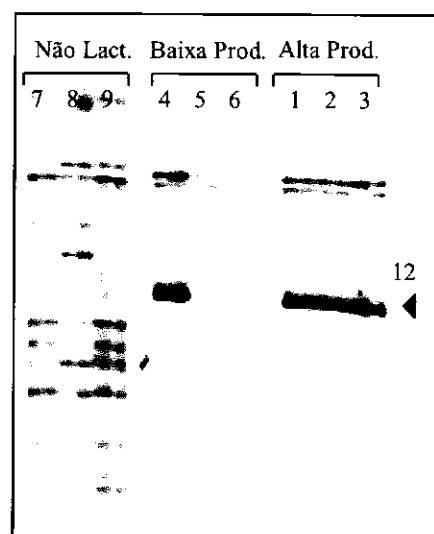


**Figura 28.** Membrana Northern blot hibridada com a sonda (11). Gel de agarose com rRNA. Ovelhas de elevada produção (n=3), baixa produção (n=3) e não lactentes (n=3). Controle negativo com fibroblastos fetais de ovelha.



**Figura 29.** Valores médios ( $\pm$  erro padrão) da densitometria do sinal de Northern blot, sonda 11. A densidade foi normalizada para a banda de rRNA 28S. ((a) e (b) significativamente diferentes  $p < 0,05$ ).

Foi verificada nos animais de elevada produção de leite a presença da banda candidata 12 (figura 30) de forma nítida e intensa. Também esta banda se observou a existência com a mesma nitidez e intensidade na ovelha 4, e de forma menos acentuada no animal 5 do grupo de baixa produção de leite. Não se descobriu a banda candidata no animal 6 de baixa produção, nem nas ovelhas secas. Esta banda apresenta 291 bp de comprimento e alinha com 259 bp do mRNA codificado pelo gene

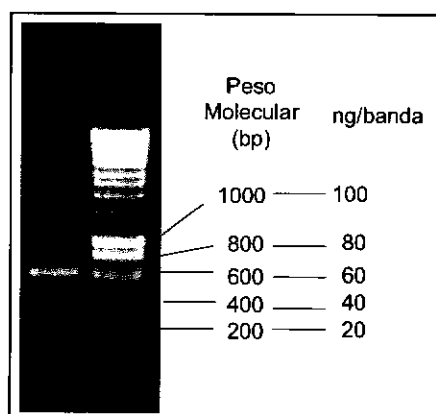


da  $\beta$ -caseína. É interessante notar que também antes nos géis realizados na ULE (banda 5) este gene surgiu como candidato para a expressão diferencial entre ovelhas de elevada e de baixa produção de leite. O gene da  $\beta$ -caseína localiza-se no cromossoma 6q22-31 na ovelha (*Ovis aries*), na vaca (*Bos taurus*) e foi encontrado no cromossoma 6q31-33, no cromossoma 4q21,1 dos humanos (*Homo sapiens*), no cromossoma 5 à distância de 44,91 cM do rato (*Mus musculus*) e no cromossoma

14p21 da ratazana (*Rattus norvegicus*), enquanto no porco (*Sus scrofa*) foi encontrado no cromossoma 8 (<http://www.informatics.jax.org/>) (tabelas 4 e 5). Depois da purificação da banda candidata (figura 31) esta foi

utilizada como sonda para a realização da técnica de Northern blot. Os resultados obtidos com esta técnica permitiram-nos comprovar que o mRNA da  $\beta$ -caseína não se expressa na glândula mamária das ovelhas Churra quando estas não produzem leite. No entanto, o nosso estudo não nos permitiu confirmar, como seria de esperar dos géis DD, diferenças significativas entre animais de elevada e de baixa produção de leite (figuras 32 e 33).

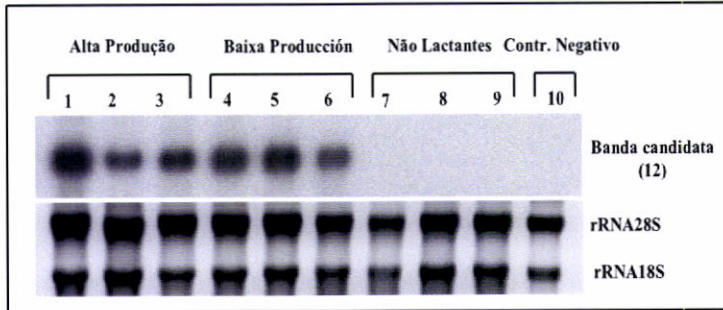
**Figura 30.** Gel de DD com banda candidata (12) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



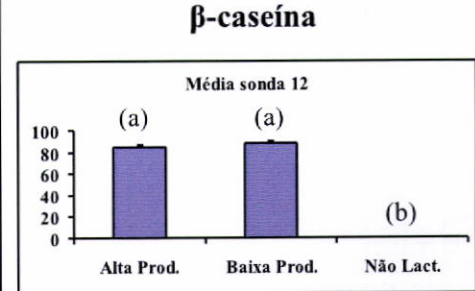
**Figura 31.** Sonda purificada para Northern blot.



Também não se observa expressão de  $\beta$ -caseína em fibroblastos fetais de ovelha, como seria de esperar.



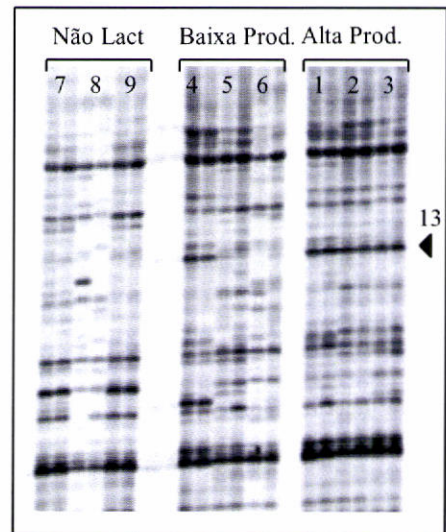
**Figura 32.** Membrana Northern blot hibridada com a sonda (12). Gel de agarose com rRNA. Ovelhas de elevada produção (n=3), baixa produção (n=3) e não lactentes (n=3). Controlo negativo com fibroblastos fetais de ovelha.



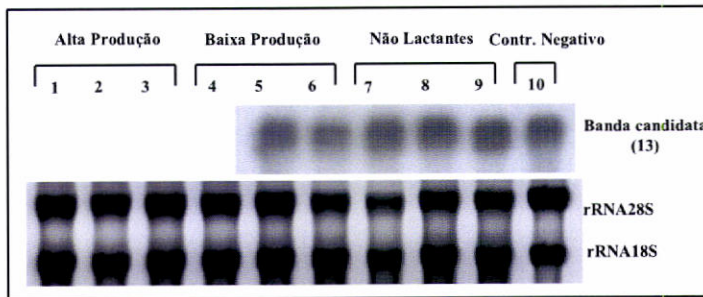
**Figura 33.** Valores médios ( $\pm$  erro padrão) da densitometria do sinal de Northern blot, sonda 12. A densidade foi normalizada para a banda de rRNA 28S. ((a) e (b) significativamente diferentes  $p < 0,05$ ).

## Resultados

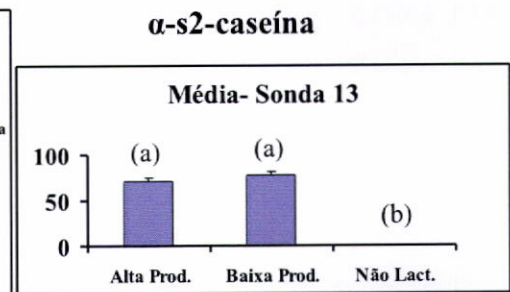
A banda candidata 13 que se pode observar na auto-radiografia do gel DD (figura 34) apresentou grande intensidade em todos os animais do grupo de elevada produção e nas amostras duplicadas do animal 4. No entanto, não se observou de forma nítida nos outros animais do grupo de baixa produção de leite. Nos animais secos praticamente não se vislumbra esta banda. A banda candidata apresenta 404 bp, que alinham com (378/381) do mRNA codificado pelo gene da  $\alpha$ -s2-caseína de ovelha (*Ovis aries*) (tabela 4). Este gene localiza-se no cromossoma 6 da ovelha, no cromossoma 6q31 dos bovinos (*Bos taurus*) e no 4 da cabra (*Capras hircus*). No rato (*Mus musculus*) foi encontrado no cromossoma 4 à distância de 44,9 cM, enquanto na ratazana (*Rattus norvegicus*) no cromossoma 14p21 (tabela 4 e 5). Tal como antes, realizámos a técnica de Northern blot para confirmar os resultados obtidos por DD, permitindo (figura 35) constatar que o gene da  $\alpha$ -s2-caseína se expressa na glândula mamária de ovelhas produtoras de leite, mas não quando os animais estão secos. Não foi observado sinal de hibridação da sonda com o controlo (fibroblastos fetais de ovelha). A intensidade das bandas resultantes de Northern blot não nos permitiu observar diferenças significativas no sinal resultante da sonda da  $\alpha$ -s2-caseína entre os animais de elevada e de baixa produção de leite (figura 36). Estes resultados não confirmam a diferença entre os dois grupos (1 e 2), como seria esperado pela análise do gel de DD.



**Figura 34.** Gel de DD com banda candidata (13) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



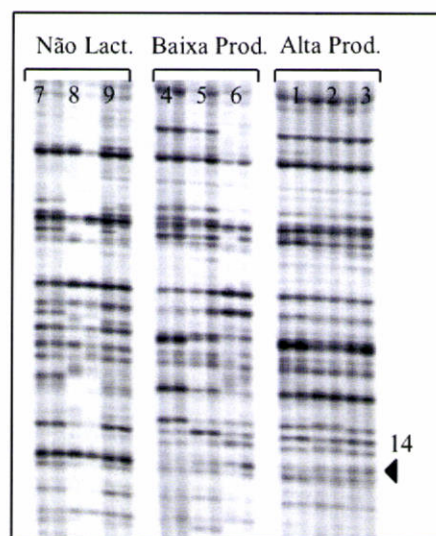
**Figura 35.** Membrana Northern blot hibridada com a sonda (13). Gel de agarose com rRNA. Ovelhas de elevada produção (n=3), baixa produção (n=3) e não lactentes (n=3). Controlo negativo com fibroblastos fetais de ovelha.



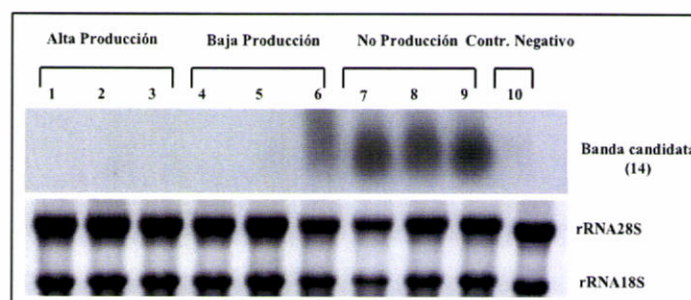
**Figura 36.** Valores médios ( $\pm$  erro padrão) da densitometria do sinal de Northern blot, sonda 13. A densidade foi normalizada para a banda de rRNA 28S. ((a) e (b) significativamente diferentes  $p < 0,05$ ).



Na figura 37, visualiza-se a banda candidata 14 de forma mais intensa nas ovelhas secas, mas também se pode perceber, embora com menos intensidade, no animal 6 de baixa produção de leite. Os 245 bp desta banda candidata são homólogos a 129 bp à previsão do mRNA similar à família 9 da carreira de solutos (transportador de sódio/potássio) isoforma 4 (LOC536970) em *Bos taurus* (tabelas 4 e 5). A realização de Northern blot corrobora os resultados de DD (figuras 38 e 39). Assim, esta é a única banda de DD em que se confirmou a regulação positiva dos animais secos, embora se possa observar, mas não de forma nítida, um pouco de expressão no animal 6 de baixa produção de leite. A sonda não hibridou com o controlo negativo (fibroblastos fetais de ovelha).

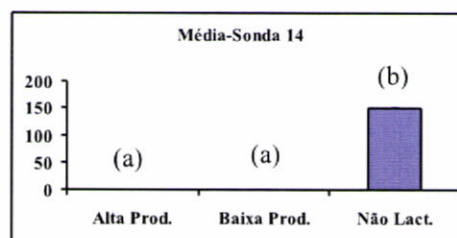


**Figura 37.** Gel de DD com banda candidata (14) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



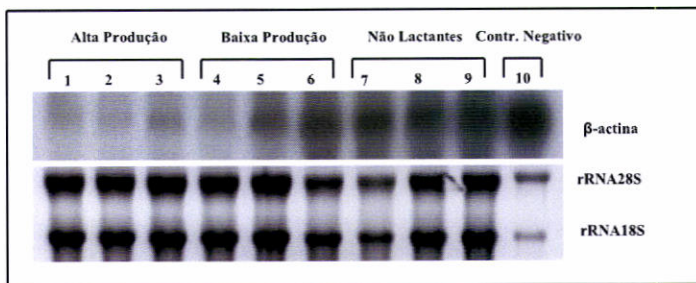
**Figura 38.** Membrana Northern blot hibridada com a sonda (14). Gel de agarose com rRNA. Ovelhas de elevada produção (n=3), baixa produção (n=3) e não lactentes (n=3). Controlo negativo com fibroblastos fetais de ovelha.

### Transportador de sódio/potássio

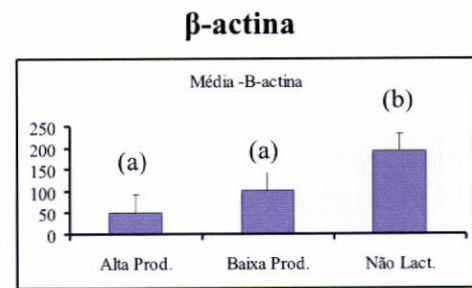


**Figura 39.** Valores médios da densitometria do sinal de Northern blot, sonda 14. A densidade foi normalizada para a banda de rRNA 28S. ((a) e (b) significativamente diferentes  $p < 0,05$ ).

Como antes se referiu, a técnica de Northern blot permite determinar a expressão diferencial do mRNA de forma semiquantitativa, comparando a densimetria do sinal da sonda a analisar e a de um controlo que habitualmente é um gene “housekeeping”. No nosso estudo tentámos utilizar como controlo de carga a hibridação com o gene “housekeeping”  $\beta$ -actina. Mas como se pode observar nas figuras 40 e 41, a intensidade do sinal obtido por esta sonda não é comparável à concentração de RNA (bandas de rRNA 28S e rRNA 18S) observada no gel de agarose-formaldeído. Por essa mesma razão, optou-se por utilizar como controlo para normalizar a expressão diferencial das sondas utilizadas a banda de rRNA 28S tingidas com brometo de etídeo no gel de agarose.



**Figura 40.** Membrana Northern blot hibridada com a sonda  $\beta$ -actina. Gel de agarose com rRNA. Ovelhas de elevada produção (n=3), baixa produção (n=3) e não lactentes (n=3). Controlo negativo com fibroblastos fetais de ovelha.

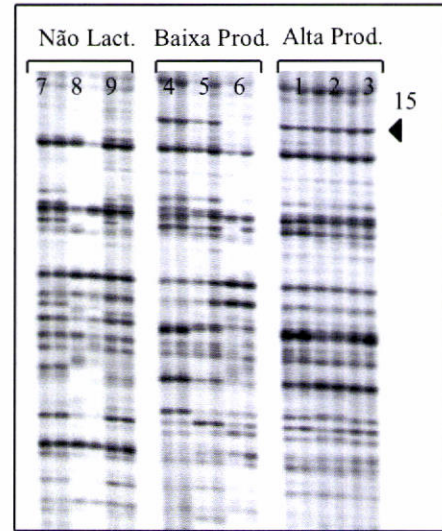


**Figura 41.** Valores médios ( $\pm$  erro padrão) da densitometria do sinal de Northern blot, sonda  $\beta$ -actina. A densidade foi normalizada para a banda de rRNA 28S. ((a) e (b) significativamente diferentes  $p < 0,05$ ).

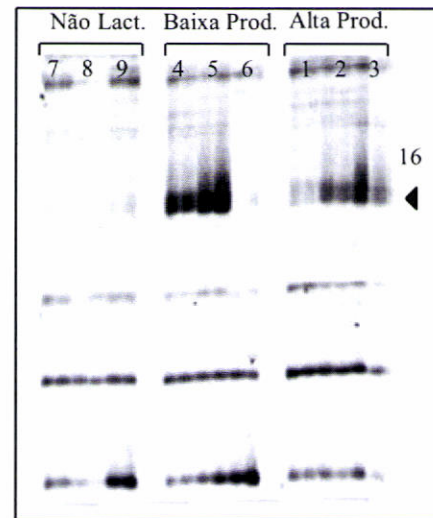


No gel de DD (figura 42) pode-se observar de forma nítida a banda 15 nos animais produtores de leite, com exceção da ovelha 6. Também não se pode analisar esta banda nos animais não produtores de leite. A banda candidata de 482 bp (com maior comprimento de todas as bandas candidatas) alinhou com 353 bp da sequência prevista de mRNA similar à proteína putativa de ligação do ácido nucleico (RY-1) (tabelas 4 e 5). No entanto, não foi possível confirmar a expressão diferencial desta sonda com a técnica de Northern blot. Nas duas vezes que se repetiu a hibridação em membranas diferentes não foi observado sinal, o que nos leva a pensar que esta banda é uma falsa positiva originada pela técnica de DD.

A análise da figura 43 permite visualizar uma intensa banda candidata 16 nos animais 2 e 3 de elevada produção de leite, assim como nos animais 4 e 5 de baixa produção. Também se pode observar esta banda candidata na ovelha 1, mas com baixa intensidade. Os 197 bp desta banda candidata são homólogos ao mRNA do receptor  $\alpha$  de estrogénio de ovelha em 180 bp. Este gene foi localizado no cromossoma 6q25,1 do homem e no cromossoma 1q12 da ratazana (tabelas 4 e 5). A técnica de Northern blot não permitiu observar qualquer sinal de hibridação, pelo que não se pode confirmar a expressão diferencial entre os grupos de ovelhas em estudo.



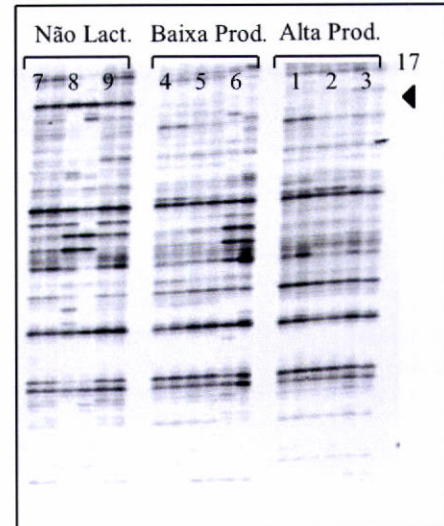
**Figura 42.** Gel de DD com banda candidata (15) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



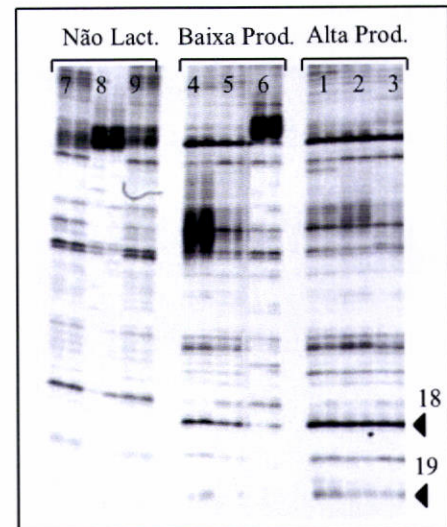
**Figura 43.** Gel de DD com banda candidata (16) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.

Unicamente foi observada a banda candidata 17 (figura 44) nos animais secos. Esta banda candidata de 236 bp é unicamente homóloga com 50 bp da sequência completa do clone RP11-520M5 no cromossoma 4 do DNA genómico dos humanos (tabelas 4 e 5). Uma vez que Northern blot com esta sonda foi repetida duas vezes em membranas diferentes e não se obteve hibridação, partimos do princípio de que é uma banda falsa positiva, obtida pela técnica de DD.

A banda candidata que designamos por banda 18 (figura 45) observou-se nitidamente em todos os animais de elevada produção de leite. Por seu lado, dois dos animais de baixa produção (4 e 5) também apresentaram esta banda, mas com uma menor intensidade, enquanto os animais na fase seca não a exibiram. Após o corte da banda do gel de DD e sua sequenciação, processos que foram realizados por GenHunter, observou-se que esta apresentava 146 bp. Utilizando a sequência de nucleótidos realizámos um alinhamento com a base pública de dados de sequências, utilizando o algoritmo BLAST. O comprimento total da nossa banda candidata 18, dos quais 97 bp alinham com 108 bp de uma sequência conhecida por RNA de ligação da proteína 35A do homem (*Homo sapiens*) (tabela 4 e 5). Uma vez que se observou de forma nítida que a intensidade/presença desta banda foi diversa nos três grupos de animais em estudo, realizou-se a técnica de Northern blot para confirmar a expressão diferencial. Embora se tenha



**Figura 44.** Gel de DD com banda candidata (17) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



**Figura 45.** Gel de DD com bandas candidatas (18 e 19) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.

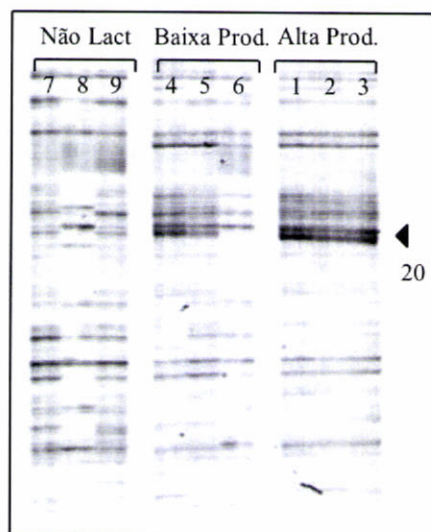


repetido duas vezes a técnica de Northern blot não foi possível observar o sinal nas auto-radiografias resultantes da exposição das membranas hibridadas com esta sonda. Uma vez que se repetiu em duas ocasiões diferentes o Northern blot com várias membranas, pensamos que a falta de sinal se deverá à não hibridação da sonda. Desta forma, parece-nos que a banda candidata 18 é o que se pode designar por “falsos positivos” resultante da técnica de differential display.

Também se pode observar na figura 45 a banda candidata 19, que se visualiza nos animais do grupo 1, enquanto unicamente se distingue numa das repetições da ovelha 4 pertencente ao grupo de baixa produção. Por seu lado, não se aprecia em nenhum membro do grupo de animais secos. Esta banda candidata, com menor comprimento (133 bp) é homóloga em 94 bp à sequência de DNA do clone RP11-124M17 do cromossoma 9 humano (tabelas 4 e 5).

Uma vez que a intensidade da banda candidata é relativamente pequena comparativamente às outras, optou-se por não realizar a técnica de Northern blot, não sendo assim possível confirmar a expressão diferencial.

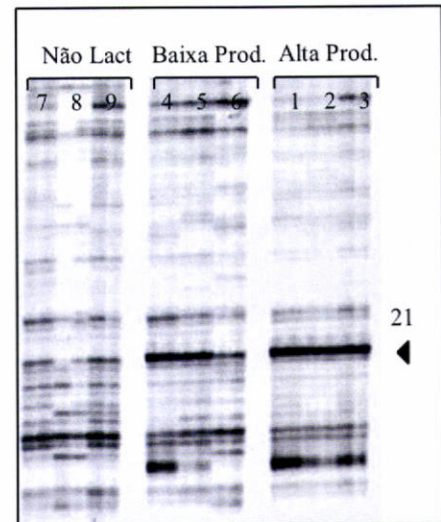
Na figura 46 pode-se visualizar nitidamente a banda candidata 20 em todos os animais de alta produção, mas também se pode ver em duas das ovelhas de baixa produção (4 e 5). Embora de forma pouco nítida, esta banda também foi observada nos animais secos (7 e 9). A banda candidata (240 bp) é homóloga unicamente em 24 bp à sequência completa do clone RP11-467C18 no cromossoma 1 humano (tabela 4). Uma vez que a diferença de intensidade entre os grupos de animais em estudo não é muito grande, não realizámos a confirmação por Northern blot.



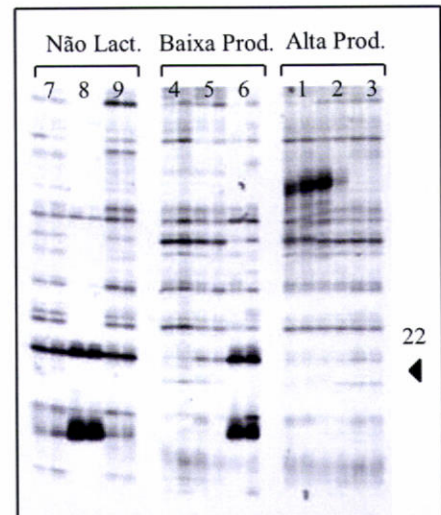
**Figura 46** Gel de DD com banda candidata (20) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.

Observou-se a banda candidata 21 (figura 47) com uma forte intensidade em todos os animais de elevada produção e em dois de baixa produção. Apesar de na ovelha 6 deste último grupo se analisar de forma nítida, esta apresenta menor intensidade. Também se pôde apreciar esta banda, embora de forma menos intensa, nos animais 7 e 9 do grupo de animais secos, enquanto no animal 8 unicamente se pôde observar com menor nitidez numa das amostras duplicadas deste animal. Esta banda tem o comprimento de 155 bp, dos quais unicamente 28 hibridam com a sequência completa da 3 BAC - 543P4 do homem (tabelas 4 e 5). Esta banda, comparativamente a outras, não pareceu mostrar no gel de DD uma diferença na expressão de forma nítida entre os animais de elevada e de baixa produção, para além de parecer igualmente que se pode expressar em animais secos, pelo que optámos por não seguir a análise com a técnica de Northern blot.

A banda candidata 22 (figura 48) expressa-se debilmente nos animais de alta produção de leite e nos animais de baixa produção, sendo excepção o animal 6, em que se pode observar nitidamente esta banda. No entanto, é intensa nos animais não lactentes. O comprimento da banda candidata é de 203 bp, dos quais unicamente 23 alinham com a sequência completa do clone RP23-462C14 do cromossoma 9 do rato (*Mus musculus*) (tabela 4). Não se optou pela confirmação da expressão diferencial, com a realização da técnica de Northern blot, porque



**Figura 47.** Gel de DD com banda candidata (21) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



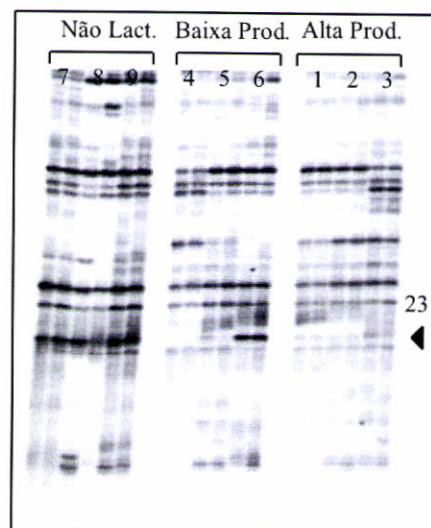
**Figura 48.** Gel de DD com banda candidata (22) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



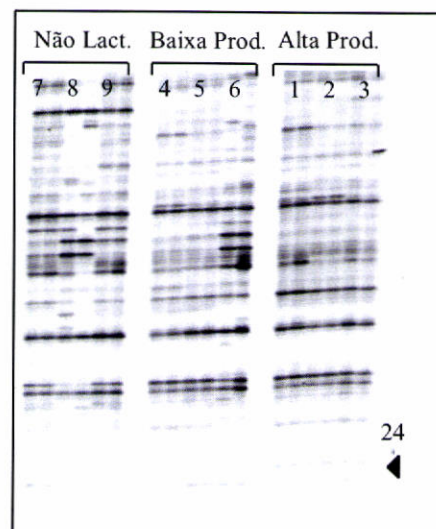
embora esta banda se possa visualizar nos géis de DD com maior intensidade nos animais secos, também se pode observar com alguma intensidade nos outros grupos de animais em estudo.

No gel de DD (figura 49) a banda candidata 23 praticamente não se visualiza nos animais de elevada produção de leite, mas se encontra nitidamente na ovelha 6 de baixa produção assim como em todas as ovelhas secas. Esta banda de 211 nucleótidos é homóloga com 23 bp da sequência completa do clone: RP11-700F9 no cromossoma 11 do DNA genómico do homem (*Homo sapiens*) (tabelas 4 e 5). Optámos por não confirmar a expressão diferencial.

Embora com pouca intensidade, unicamente é visível a banda candidata 24 nas ovelhas de elevada produção (figura 50). Os 142 bp desta banda candidata são homólogos em 102 bp à sequência completa da BAC CH240-268P24 de *Bos taurus* (tabelas 4 e 5). Não se optou por comprovar a expressão diferencial com a técnica de Northern blot, devido à pouca intensidade desta banda nas ovelhas de alta produção.



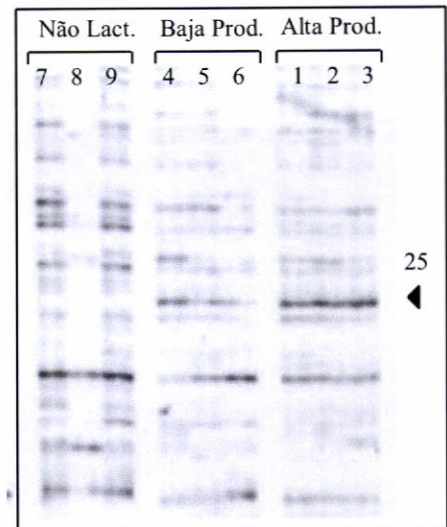
**Figura 49.** Gel de DD com banda candidata (23) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



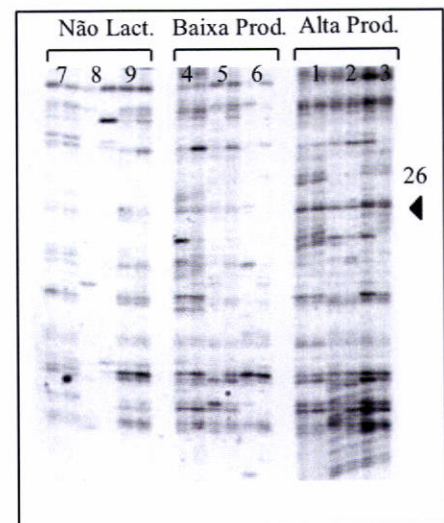
**Figura 50.** Gel de DD com banda candidata (24) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.

O exame da figura 51 permite visualizar a banda candidata 25 com maior intensidade nos animais de alta produção de leite. Pode-se também divisá-la nos animais de baixa produção, mas é imperceptível nas ovelhas secas. A utilização do BLAST permitiu o alinhamento desta banda (238 bp) com 202 bp do gene da caseína  $\alpha$ -S1, alelo F, exão 1-19, de *Capra hircus* (tabelas 4 e 5). Decidimos não realizar a técnica de Northern blot para confirmar a expressão diferencial desta banda candidata, uma vez que já confirmámos que o mRNA da  $\alpha$ -s1-caseína da ovelha (*Ovis aries*) (banda candidata 25) se expressa em animais produtores de leite, mas que não se observa diferença entre as ovelhas de baixa e de elevada produção.

A banda candidata 26 é mais intensa nas ovelhas de elevada produção de leite, mas também se pode perceber nos animais de baixa produção (figura 52). Os 241 bp desta banda alinham com 204 bp do mRNA da proteína ribossoma S25 (OVRPS25) de *Ovis aries* (tabelas 4 e 5). Optámos por não confirmar a expressão diferencial desta banda candidata porque não é muito intensa nas ovelhas de elevada produção.



**Figura 51.** Gel de DD com banda candidata (25) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.

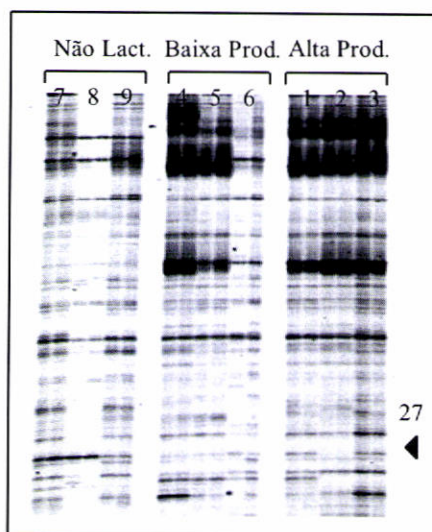


**Figura 52.** Gel de DD com banda candidata (26) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.

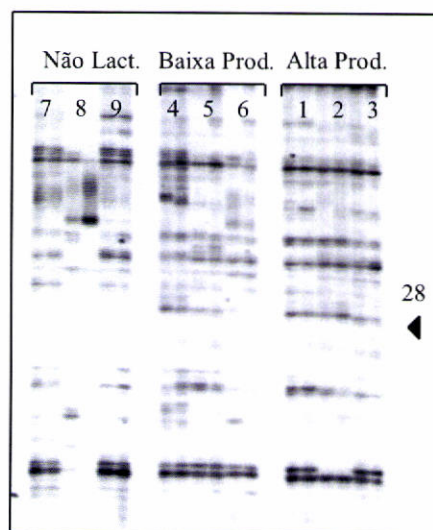


Pode-se observar com alguma intensidade a banda candidata 27 nas ovelhas secas 7 e 8, mas menos intensamente nas ovelhas produtoras de leite (figura 53). A utilização do BLAST permitiu verificar uma pequena homologia da nossa banda candidata (355 bp) com o mRNA para lipofilina em C de *Homo sapiens*. O gene da lipofilina C foi localizado no cromossoma 11q13 do homem. Optámos por não realizar a técnica de Northern blot para confirmar a expressão diferencial, porque a diferença de intensidade da banda candidata entre os grupos de animais em estudo não é muito acentuada.

Surge em todos os animais de alta produção a banda candidata 28, mas também se pode visualizar nas ovelhas 4 e 5 de baixa produção (figura 54). Nos outros animais não se observa. Unicamente existe uma homologia de 23 bp entre a nossa banda (190 bp) e a sequência completa da 12 BAC RP11-693J15 do homem (tabelas 4 e 5). Uma vez que a intensidade da banda 28 nos géis de DD não é muito forte, não se realizou a técnica de Northern blot para confirmar a expressão diferencial.



**Figura 53.** Gel de DD com banda candidata (27) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



**Figura 54.** Gel de DD com banda candidata (28) para a expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas de alta (n=3), baixa produção de leite (n=3) e não lactentes (n=3). Amostras em duplicado.



**Tabela 4.** Homologia das bandas candidatas com sequências públicas de bases (BLAST). Banda candidata, comprimento (bp) da banda candidata, homologia de sequência homóloga à nossa (BLAST), identidade e localização cromossômica da sequência homóloga.

Banda Candidata	Comprim. (bp)	Sequência Homóloga (BLAST)	Identidade (%)	Localização Cromossoma
8	431	mRNA de glicerol-3-fosfato acetiltransferase da mitocôndria (GPAM) de <i>Bos Taurus</i>	289/329* (87%)	BTA-26 HSA-10q25,2 PTR-10 MMU-19 (52,0 cM) RNO-1q55
9	140	Genoma completo da mitocôndria de <i>Ovis aries</i>	117/117 (100%)	
10	276	Previsão do mRNA parcial similar ao domínio de tetramerização contendo o canal 3 de potássio (LOC505221) em <i>Bos taurus</i>	247/257 (96%)	
11	280	mRNA da caseína $\alpha$ -S1 de <i>Ovis aries</i>	261/262 (99%)	OAD-6 BTA-6q26-33 HSA-4q21,1 SSC-8 MMU-5 (44,9 cM) RNO-14p21
12	291	mRNA da $\beta$ -caseína de ovelha	259/260 (99%)	OAD-6q22-31 BTA-6q31-33 HSA-4q21,1 SSC-8 MMU-5 (44,91cM) RNO-14p21
13	404	mRNA da caseína $\alpha$ -S2 de <i>Ovis aries</i> (LOC443383)	378/381 (99%)	OAD-6 BTA-6q31 CHI-4 MMU-5 (44,9cM) RNO-14p21
14	245	Previsão do mRNA similar à família da carreira de solutos 9 (transportador de sódio/potássio) isoforma 4 (LOC536970) em <i>Bos taurus</i>	129/145 (88%)	HSA-2q12,1 MMU-1 (40,5 cM) RNO-9p21
15	492	PREVISTO: <i>Bos taurus</i> similar à proteína putativa de ligação ao ácido nucleico (RY-1), variante 1 da transcrição (LOC512552), mRNA	353/364 (96%),	BTA-11

\*A banda candidata 8 é homóloga em 289 bp de 329 bp (87%) ao mRNA de glicerol-3-fosfato acetiltransferase da mitocôndria (GPAM) de *Bos Taurus*

- Expressam-se em ovelhas produtoras de leite       Falsos positivos  
 Expressam-se em ovelhas não produtoras de leite       Não foi confirmada a expressão diferencial



**Tabela 4.** Homologia das bandas candidatas com sequências públicas de bases (BLAST). Banda candidata, comprimento (bp) da banda candidata, homologia de sequência homóloga à nossa (BLAST), identidade e localização cromossômica da sequência homóloga (continuação).

Banda Candidata	Comprim. (bp)	Sequência Homóloga (BLAST)	Identidade (%)	Localização Cromossoma
16	197	mRNA do receptor $\alpha$ de estrogênio em <i>Ovis aries</i>	180/181 (99%)	HSA-q25,1 RNO-1q12
17	236	Sequência completa do clone RP11-520M5 no cromossoma 4 do DNA genômico de <i>Homo sapiens</i>	50/57 (87%)	HSA-4
18	146	<i>Homo sapiens</i> RNA da proteína 35A (RBM35A) -, variante 2 da transcrição mRNA	97/108 (89%)	HSA-8q22,1 MMU-4
19	133	Sequência de DNA do clone RP11-124M17 no cromossoma 9 humano	94/103 (91%)	HSA-9
20	240	Sequência completa do clone RP11-467C18 no cromossoma 1 <i>Homo sapiens</i>	24/24 (100%)	HSA-1
21	155	Sequência completa da 3 BAC - 543P4 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC (Library) <i>Homo sapiens</i>	28/28 (100%)	
22	203	Sequência completa do clone RP23-462C14 do cromossoma 9 de <i>Mus musculus</i>	23/23 (100%)	MMU-9
23	211	Sequência completa do clone:RP11-700F9 no cromossoma 11 do DNA genômico de <i>Homo sapiens</i>	23/23 (100%)	HSA-11
24	142	Sequência completa da BAC CH240-268P24 (Children's Hospital Oakland Research Institute Bovine BAC Library (masculino)) <i>Bos taurus</i>	102/108 (94%)	
25	238	Gene da caseína $\alpha$ -S1, alelo F, exão 1-19, de <i>Capra hircus</i>	202/219 (92%)	OAR-6 BTA-6q26-33 HSA-4q21,1 SSC-8 MMU-5 (44,9 cM) RNO-14p21 BTA-11q23,3
26	241	mRNA da proteína ribossoma S25 (OVRPS25) de <i>Ovis aries</i>	204/207 (98%)	BTA-11q23,3
27	355	mRNA para lipofilina C em <i>Homo sapiens</i>	51/57 (89%)	HSA-11q13
28	190	Sequência completa da 12 BAC RP11-693J15 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC (Library) <i>Homo sapiens</i>	23/23 (100%)	

Expressam-se em ovelhas produtoras de leite

Falsos positivos

Expressam-se em ovelhas não produtoras de leite

Não foi confirmada a expressão diferencial

Tabela 5. Sequência de nucleótidos das bandas candidatas (GenHunter).

Banda Candidata	Sequência de Nucleótidos
8	CCCCGAGTATAAATTATTTGATGTACCACTGTTTTAAACCACTCTTTTAGGACTTGAGATTG GCATCCGGCATTTCAGTTTANACAAAAATGATGGMNTTGAAAGAACTTTTACTTTATTTTC TAAACATCTAAAGTTCTGAGATGCCTTGATGGANNGTGTNAACTGTTTGCCTGTTGNACAN AGANATGTTAGATTGTTGTAAAAAGGTTGATTATGANNACCATAAAATNNATGGTGTGATGC TGTGAATGAACTGATTTGNAATGTGGATTGAATTTTACGCCTGTTAATATACTGTAAGAAG CCNAGGTGTAGCTTTGTTTAAATAAACCAAAAAGTGAATATATTCTTCATGTTTTGTATCT GTCGTTAAAAGTTCCCTANNTAATTCGTTATACAAACACTTCTTGTTCACCTCACATN
9	AAGCTTACGCAACCCACTACCTAAAATTTAATTATCCATCAAACACATTCAAATTTCTCTAAC CTATTAGGATATTATCCTACAATTATACACCGCCTGACCCCCATATAAACCTAACATAAG CCAAAAAAGCTT
10	AAGCTTACCAGGTATTTAATGAGGTGCTATGTTTGTGGAAAAATATGTAATTCAAAAACT ATTGAATACCAGATTGCTCTGTGTAGTACTAAGTCCCTTTGGGATAATTTAATTGTGGTCAT TTCTGATTCTCATTGTTGGAGTACTTAAGTCTTAGCAAGTATCACCAATATTAATGTCAA AAATCCATTTAAAAACTTTCTTCAAAGTTGGAGCAACTGTTTGAAACAGATGAAATAAAGACA GTTTTGAGTGCCAAAAAAGCTT
11	AAGCTTGAGTGCTCTATTGTATTTTAGATTGTGTAAACATCCTTAAGTGAAATGTCTTAAGA GCTTGTACCTAAATTCAGTAGTATCATGCTGGTATAAAGGCCACTGAGTCAAAGGGAAT ACAGTCTTCATTAATTTCTATATGAAAAATGTTTTAAAGCCTTTGAATCACCTCTCTGT AAGTGCCATCATTTCAAATAACTGTGTGCAGTAACTGAGATTTTGTCTTTCTTTTCAAT AAATTACATTTAAGGCAAAAAAAGCTT
12	ATGCTACNAANMNCNTTTTAAATGAGAATACATGGAAACAAAAATGAAACTTTATTCCTT TATTTATTTTATGCTTTTTCATCTTAATTTGAATTTGAGTCATAAACCATATACTTTCAAAA TGTTAATTCACATTAGCATAAAAAGTTGAGTTTAACTTGGAAATATCATGAACATATCAAA ATATGTATAAAAAATAATTTCTGGAATTTGATTTATTTCTTTAAGAATCTATTTCTTAACC AGTCATTTCAATAAATTAACCTTTAGGCAAAAAAANCTT
13	AAGCTTCGACTGTTGATCAGCATCAGAAAGCTATGAAGCCATGGACTCAACCTAAGACAAAC GCTATTCCTATGTGAGGTACCTTTAAGATTTTGAATTAACCTGCTTCTACCTGGTTATGGT TGGACTGGAAATCTATCTTCTACAGTTTCTTATCTACCCTTTACTTTCATACAAACCAGCAT GTTTGGGTGGCACATCGATAAGACAAATCGCAGAGTATTTCTGAAATTTTATACTCTCG CTGTTAGTTTATATTGAATATACTGGGTTTATATGGTGGTTTCATACAAACTTAGCTGATGA TTATTTAAATCCTTTCCCTAATCTTTCTGAGTTACAGAAATATTTTCTTTCCCTCTGGAA ATAAATGTCAAGTGCAAAAAAANNNCTT
14	AAGCTTACCAGGTGGCACAGTGGTAAAGAAATTCACCTGCCAATGCAGGAGACAGAAGAGACA CTGGTTTGATCCCTGGATCAGGAAGATTCCTTGGAGTAGAAGAAATGGCAACCCACTCCAGT ATTCCTGCCTGGAAATTCATGGTTCAGAGGACCTGATGGCTACAGTCTTTGGGTAGCAA AGAGTCGGAGATGACAGCACACACACGTACTCTATTTCTTCTCAAAAAAAGCTT
15	AAGCTTACCAGGTCCCAAGACGACATAGATCCACATCTCCTTCCCTTCTCGACTGAAAGA AAGAAGAGATGAGGAGAAGAAAGAAACAAAAGAAACAAAGAGCAAAGAACGCCAGATAACTG AGGAAGACTTAGAGGGCAAAACAGAGGAAGAAATAGAAAATGATGAAGTTAATGGGATTTGCC TCCTTTGACTCCACAAAAGGGAAAAAGGTGGATGGCTCTGTACATGCCATATGCCATAAATGT GTCTCAGAAGAGGAAGTATAGGCAGTACATGAATCGAAAAGGTGGATTCAACAGACCTTTGG ATTCATTGCATGAGCTGAAGTATGAAGAATGATGTTTTTCCCTCATCTTGTTCAGAAAAA TGGATTTTTGTATTTAATGTGCATCAAAAACAGGATCAGAGTCCCTTCCCTTGTAAAGTAA GAAAATTTTATTTATGATGTATGTAGTTTACTTACCCAGCCTCAAAAAAAGCTT

**Tabela 5.** Sequência de nucleótidos das bandas candidatas (GenHunter) (continuação).

Banda Candidata	Sequência de Nucleótidos
16	AAGCTTGTGTGCACTATGTATTCTTCAGTGTAGAGCTCTTGTTTTTACGGGGAAAAGCTCA AATGCCAAATTGTGTTTTGATGGATTAATACGCCAATGCATACTATTATTGATGTGATTCTGT TTTGTTCAGCTTTGCTTTGTTTAAATGAAACACACTTGTAACCTCTTTTGCACCTTACAAA AAAAAAAANTT
17	AAGCTTGGAGCTTGGATAGGGATTATACCAAATCTATACATCAATTTGTGGAGTATTGCCAT TTTAAACAATCAAATTTTTTAAACCCACAAACATGGATATCTTTTCACTTAATTCCTTTCAATG ATGTTTTTTAGTTTTTCACTTTTCACTTCCAACCTTTTTCAAGATTGTTTTAGCTGTTTTATTTT CATGTGAATTTTAGGAATAGCTTGTGAAGTTCTGCCAAAAAAAAAANTT
18	AAGCTTGATTGCCTTAAGATGCTGTTTGCCCAGAGCTCTGAAAGACTTTAAGATAGGCAGTA ATACTACAATACTACTGAATTTTTGTAGAATTGTTACATTTGATAATAAACTTGCCTGTTG AATCTCCAAAAAAAAAAGCTT
19	AAGCTTGATTGCCCTGTAATAGCTATCGACAGCTTTAGGCATATGTATGTGTTTGGAGACTT CAGGGATGTATTGTAAGTATTCATTTTGGTTTTTAAAATCACTGATCTGTGTCTCAAAAA AAAAAGCTT
20	AAGCTTGGAGTGTGCATATGTATTTAGTTATTGGATAACGACATCTGTAAATGCCGCTAATA ATATCATGTACATGTACATATTCATGTGATCAAATTGAGATTTGTATGACTTAACTCACCCA AGATCACATGCTAGTTGGTGTAGGAGCTGGAATTCAACTTAGACTCTATAACACTAGAGTC CTTGTTTATAATCACTATGATATGCTGCCTTTCTTTCTCAAAAAAAAAAAGCTT
21	AAGCTTTGGTTCAGGAGATGCTTAAACCGCTGGACCATCAGGGAAGTCCCTGAAGTAGTCTGAT TTTGGACTGTGAAAATACCATGTGATAGCTAAGGAAAAGACTGTATTAGTTTTCTGTTGCTG CATAGCAGAATACCCCAAAAAAAAAAAGCTT
22	AAGCTTAAACGAGGAAAACAAAAATATCATGGCCTTAAACAGGGTCACAGAAAATACTAAGT AAACTGAAAATGTTGATAAACTGTACTATGTTAATATTAAGAATTTTTTCAACAAAAACA CAATTTAAAAGATAAACTTTTTTAGTAGATTGGAGAAAATATTTGCCATAAAATGTATGTGA CAAAAAAAAAAAGCTT
23	AAGCTTCGGCATATTAATGAGGTACCAAAGCTGCTTTGTAAATCTTTTCATCAGAACTTTT TATTTCAATCTGGTGAAGTAAAAGTTGCCATGCAGTAACTTATTGTACATACCAAGTCCATT ATTAAGGAAGAAACAAATTTCTCTGTCTAGAGTTGGAGATATGTCCAGTCAGCAAATGATAG ACAATTATACAAAAAAAAAAGCTT
24	AAGCTTGGAGCTTCAGCATCAGTGTCTCCAGTGAATATTCAGGACTAATTTCTTTAGGGTG GACTGGTTGGATCTCCTTGCAGTTCAAGGGACTCTCAAGAGTCTTCTCCAGCATTAGCACAG TTCAAAAAAAAAAAGCTT
25	AAGCTTAGAGGCAGTAACAATGATTCCTTTCTTTTAGCAAATGAAAGCTGGAAGCAGTTTCG TCAAGTGAGGTATGTCATTTTTATGTTAATTAAGTATCCCAATTAGAAAATGTTTATGAAAG TTTGTGAACCATAAAGTTTACATGTCCCGTAAGGTTTCATCGTACAAGGCATATGTATCT AATCTATCCTAATTTAACATACAAGGCTATCAACCCCAAAAAAAAAAAGCTT
26	AANNNNNNNGGNNNTNNNCNNCTGAGAGACTTGAAAAATTCGTGGTTCCCTGGCCAGAGCAGCC CTTCAGGAACCTCCTTAGTAAAGGACTTATTAAACTGGTTTTCAAAGCACAGAGCTCAAGTGAT TTACACCAGAAACACCAAGGGTGGAGATGCCCCAGCTGCTGGTGAAGATGCATGAACAGGTC CCACCAGCTGTACATTTGAAAAATAAACTTTATTAAATCAAAAAAAAAAAGCTT
27	AAGCTTTTGTATCCCACTGTGTCCAAGGATGAATACAGAGCATATCTTAAAGATTTCTCCAG ACTGAAAATGAGGGAAATGCTATAGATGAATTAAGCAATGTTTTCTCCAGCAGTCAAATGA AACTCTGGCCAAATTTCAAACAGATGTTGGAAGTCATGTACAACAGTATATACTGTAAAGCAT TCTAATTTTCTGCAAGAACTTTGGTTCAGAAAATGTCGACTGGCGATGAGTATATACCACAAG CTGTCTGTCTTTTTTGTCTTTTAACTACACACTGCAAGACAATGTTGAAACCTCAAATAC ATTTTCATTTCAAATAAAGTATCTGCATATCAAAAAAAAAAANTT
28	AAGCTTGGCTATGGGATATGGTAAAGAGAAAAAAAAAGTATGAAAAATCAATTAAGAAACT CTCTTTATGATGTGCTATTTGTATTTACAAAAGAAATTTTAAAGAAAAACCTTGAATATTGGTA ATACTTTTCACTGCATCATCTTTGAAAAGCATGAATTAAGGTTGTCAAAAAAAAAA GCTT

## VI. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### **A. Géis de differential display realizados na Universidade de León. Obtenção do cDNA de bandas candidatas, clonagem e sequenciação. Identificação das sequências (BLAST).**

O comprimento dos *primers* arbitrários utilizados na técnica de differential display foi de 13 bases. Este comprimento está determinado estatisticamente de tal forma que cada *primer* seja capaz de reconhecer 50-100 espécies de cDNA (Liang e Pardee, 1992; Liang, 1998; Cho *et al.*, 2002; Yang e Liang, 2006; Liang *et al.*, 2007). A análise das películas de auto-radiografia dos géis de poliacrilamida desnaturizante realizados na ULE permitiu observar uma média de 58 bandas de cDNA por carril. Perante estes resultados, podemos afirmar que as condições utilizadas no nosso laboratório permitiram observar nos géis um número médio de bandas dentro do espectável.

O protocolo seguido no nosso laboratório para re-amplificar e para clonar os fragmentos de DD sugerem a utilização de fragmentos com um comprimento superior a 150 bp como bandas candidatas. No entanto, o tamanho ideal foi estabelecido entre 200 e 600 bp (RNAimage<sup>®</sup> kit). Os fragmentos das bandas candidatas obtidas na ULE variam entre 155 e 366 bp. Embora se possa considerar que o tamanho se encontra dentro do recomendado, um tamanho relativamente pequeno das bandas candidatas pode resultar num inconveniente inerente à técnica da DD. Isto é devido a que as pequenas bandas poderiam apresentar dificuldades acrescidas na confirmação da expressão diferencial com a técnica de Northern blot, já que muitas vezes não se observa sinal de hibridação quando utilizadas como sondas (Yoshikawa *et al.*, 1998; Lievens *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2007).

No nosso estudo utilizaram-se amostras de todo o tecido da glândula mamária de ovelha, tal como antes Suchyta *et al.* (2003) empregaram para averiguar diferenças da expressão de genes na glândula mamária de vacas em distintos períodos da fase de desenvolvimento.

As bandas candidatas 1, 3, 4 e 6 apresentam uma homologia muito baixa, com sequências de clones contendo sequência de DNA genómico do porco (*Sus scrofa*) e

livrarias dos cromossomas 14 e 10 humanos (*Homo sapiens*). A causa desta baixa homologia com sequências previamente conhecidas pode dever-se a que não foi sequenciado o genoma completo de muitas espécies animais, entre as quais se encontra a ovelha (*Ovis aries*). Por outro lado, também é conveniente assinalar que na bibliografia consultada foram encontradas evidências de contaminação nas bandas candidatas cortadas dos géis de DD. Isto pode dever-se a que outras bandas, do mesmo peso molecular ou similar, migrem em conjunto com os fragmentos de cDNA de interesse. Neste sentido, resulta óbvio que a possível contaminação diminuiria a homologia com sequências de DNA previamente conhecidas. Isto tornaria pouco possível a obtenção do sinal Northern blot quando se utiliza estas bandas como sonda (Averboukh *et al.*, 1996; Vögeli-Lange *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Yoshikawa *et al.*, 1998; Dilks *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2007).

A banda candidata 2 é homóloga ao mRNA similar à tubulina  $\beta$  5 de vaca (*Bos taurus*). Os polipeptidos tubulina  $\beta$  e  $\alpha$  formam os microtubos. Estes, por sua vez, estão implicados numa grande variedade de processos celulares, entre os quais se inclui a mobilidade celular, o transporte citoplasmático e a mitose (Tuszynski *et al.*, 2006). Dadas as suas características e implicações celulares, seria possível esperar que, de algum modo, o gene similar à tubulina  $\beta$  se expressasse de forma diferencial na glândula mamária de ovelhas de elevada e de baixa produção de leite. No entanto, a falta de resultados relativos a outras bandas candidatas que nos permitisse confirmar uma expressão diferencial entre os dois grupos de animais não tornou conveniente continuar com a confirmação da expressão diferencial desta banda.

No nosso estudo, foi observado que as bandas candidatas 3 e 4 são complementares uma da outra, apresentando baixa homologia com a sequência completa da BAC R-433J8 da livraria RPCI-11 do cromossoma 14 de *Homo sapiens*. A complementariedade encontrada pode ter explicação na ligeira diferença, na mobilidade das cadeias complementares de DNA em géis de poliacrilamida desnaturalizada, parecendo assim duas bandas candidatas diferentes (Liang *et al.*, 1993). Tal como sucedeu no presente estudo, Liang e colaboradores (1993) enfatizaram que este fenómeno é mais frequente em bandas menores de 300 bp (Liang *et al.*, 1993).

Nos géis realizados no nosso laboratório e no de GenHunter foi obtida como possível candidata à expressão diferencial a sequência homóloga ao gene da  $\beta$ -caseína

(bandas 5 e 12). No entanto, a confirmação pela técnica semiquantitativa da expressão diferencial deste gene no úbere de ovelhas de elevada e de baixa produção de leite não permitiu confirmar esta diferença.

A banda candidata 7 obtida nos nossos géis é homóloga ao mRNA do homodomínio da proteína IRXA2 (IRX2) do homem (*Homo sapiens*). Os genes dos homodomínios das proteínas IRX exercem uma função reguladora no desenvolvimento da estrutura da cabeça, dos olhos, das veias, do coração e do sistema nervoso dos embriões (Christoffels *et al.*, 2000; Lebel *et al.*, 2003). Portanto, esta banda provavelmente poderia ser falsa positiva, isto é, a análise com a técnica de Northern blot não permitiria a observação de expressão diferencial ou falharia a detecção da sonda (Luce e Burrows, 1998).

Não se confirmou a expressão diferencial em ovelhas de elevada e de baixa produção de leite das bandas candidatas obtidas a partir dos géis realizados na ULE. Por outra parte, alguns dos segmentos candidatos dos géis de GenHunter para a expressão diferencial dos mesmos animais foram utilizados como sondas na técnica de Northern blot. Neste caso, incluíram-se ovelhas em fase não produtiva. No presente estudo, a realização desta técnica semiquantitativa não permitiu expor diferenças na expressão entre as ovelhas produtoras de elevada e de baixa quantidade de leite, incluindo, como já foi referido, a sonda homóloga ao gene da  $\beta$ -caseína.

Os resultados observados neste trabalho apresentam homologia com alguns genes previamente conhecidos, como é caso da  $\beta$ -caseína (banda candidata 5). No entanto, não foi observada homologia alguma das bandas candidatas com regiões codificantes. Isto dever-se-á às características da técnica de DD, uma vez que as bandas candidatas geralmente correspondem ao extremo 3' do gene, que representa principalmente a região não traduzida (Yoshikawa *et al.*, 1998; Lievens *et al.*, 2001).

Não obstante, chama a atenção que os resultados obtidos com animais de elevada e de baixa produção no laboratório da ULE e no laboratório de GenHunter, com excepção do gene da  $\beta$ -caseína (bandas candidatas 5 e 12), sejam distintos. A causa desta falta de reprodutibilidade dos resultados poderá dever-se a factores intrínsecos à técnica de differential display, mas principalmente a factores extrínsecos à técnica, que variam entre laboratórios. É conveniente assinalar que as amostras de RNA que foram utilizadas nos dois laboratórios procedem de extracções diferentes. Embora as técnicas



tivessem sido realizadas seguindo as recomendações do protocolo, as preparações das reacções de RT e de PCR foram realizadas em distintos laboratórios, por pessoas diferentes. Também foi assinalado que tanto os termocicladores como os tubos de PCR podem influir de certo modo na reprodutibilidade dos resultados (Vögeli-Lange *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Liang, 1998).

Um dos investigadores que desenvolveu a técnica de DD afirmou que a mesma pode ser reproduzível sempre e quando não existam factores internos ou externos impeditivos (Liang, 1998). Assim, por exemplo, este autor refere que, partindo da divisão de uma quantidade igual de uma mistura de PCR em cinco tubos de PCR de parede fina, o padrão de exibição de cDNA nos géis é exactamente o mesmo. Mas, por sua vez, a preparação de cinco reacções individuais de forma independente, e devido a erros de pipetagem, poderá originar que o padrão de cDNA amplificado não seja o mesmo (Liang, 1998). O exemplo assinalado por este autor permite ter uma ideia de como alguns factores poderiam originar diferenças nos resultados.

Não deixa de ser surpreendente o facto de que no nosso laboratório se tenha obtido poucas bandas candidatas para a expressão diferencial em tecido da glândula mamária de ovelhas de elevada e de baixa produção de leite. No entanto, é conveniente assinalar em primeiro lugar que, se existem diferenças na quantidade de leite produzido entre os animais de alta e de baixa produção, estas podem não ser suficientemente elevadas para evidenciar a expressão diferencial nos resultados obtidos com as técnicas que foram empregues no presente estudo. Em segundo lugar, Liang (1998) assinalou a possibilidade de encontrar um maior número de fragmentos falsos positivos quando se comparam amostras do mesmo tecido de diferentes animais, do que quando se comparam amostras de diferentes tecidos do mesmo animal. Neste sentido, todas as amostras utilizadas no presente estudo provêm do mesmo tecido, o que poderia contribuir para que as diferenças que caberia esperar não se houvessem manifestado.

**B. Géis de differential display realizados em GenHunter. Obtenção do cDNA das bandas candidatas a partir de colónias de bactérias transformadas. Identificação das sequências (BLAST). Confirmação da expressão diferencial (Northern Blot)**

As 60 bandas que se observam em média em cada carril dos géis de DD estão dentro do esperado pela técnica e pelos resultados obtidos no laboratório da ULE (Liang e Pardee, 1992; Liang, 1998; Cho *et al.*, 2002; Yang e Liang, 2006; Liang *et al.*, 2007).

Embora o protocolo de GenHunter recomenda re-amplificar e clonar os fragmentos de DD com um comprimento superior a 150 bp estabelecido entre 200 e 600 bp – tamanho ideal (RNAimage<sup>®</sup> kit) –, os 21 fragmentos das bandas candidatas obtidas por GenHunter apresentam um comprimento variável entre os 133 e os 492 bp. Não podemos esquecer que bandas pequenas obtidas a partir de géis de DD poderiam apresentar maiores dificuldades na confirmação da expressão diferencial com a técnica de Northern blot, já que, quando utilizadas como sondas, falham muitas vezes o sinal de hibridação (Yoshikawa *et al.*, 1998; Lievens *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2007).

Foram detectadas 21 bandas candidatas nos géis de DD. Uma vez que não nos foi possível confirmar a expressão diferencial de todas, optámos por utilizar onze como sonda de Northern blot para confirmar os resultados obtidos nos géis de DD. Estas sondas foram escolhidas com base na sua intensidade/presença e na homologia nos resultados do BLAST.

Como já se referiu, estas bandas candidatas foram clonadas e sequenciadas. Foi confirmada a expressão diferencial em sete bandas candidatas entre os grupos de ovelhas em estudo (bandas 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14). Com excepção de uma das bandas candidatas (14), todas apresentaram maior expressão nos animais produtores de leite face a ovelhas secas. As restantes quatro bandas candidatas em que não se obteve confirmação mediante a técnica de Northern blot parecem ser falsas positivas (bandas 15, 16, 17 e 18).

Os resultados obtidos após a confirmação da banda candidata (8) com a técnica de Northern blot permitem sugerir que a enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase da mitocôndria (GPAM) se expressa na glândula mamária de ovelhas lactentes, enquanto não ocorre em ovelhas secas e nos fibroblastos fetais utilizados como controlo. Por

outro lado, no presente estudo não se observaram diferenças significativas na expressão de GPAM entre as nossas ovelhas de elevada e de baixa produção.

É sabido que o período de lactação origina alterações no metabolismo de hidratos de carbonos e dos lípidos em diferentes órgãos do corpo, incluindo a glândula mamária. O objectivo destas alterações metabólicas é proporcionar glucose, acetato e ácidos gordos para a glândula mamária, com vista a suportar a síntese de leite.

Nos tecidos dos mamíferos pode encontrar-se duas isoformas da enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) (EC 2.3.1.15), que se codificam por dois genes independentes (Coleman *et al.*, 2000). As duas isoenzimas identificam-se com base nas diferenças do seu pH óptimo, dos valores de  $K_m$ , da sensibilidade ao calor e aos reactivos de sulfidril, da especificidade do substrato para a acil-CoA saturada como dador de acil e, principalmente, devido à localização subcelular. Uma das isoenzimas localiza-se na membrana externa da mitocôndria (glicerol-3-fosfato aciltransferase da mitocôndria (GPAM), enquanto na outra se poderá encontrar no retículo endoplasmático (glicerol-3-fosfato aciltransferase microssomal (GPAT) (Monroy *et al.*, 1972; Saggerson *et al.*, 1980; Morand *et al.*, 1998; Ericsson *et al.*, 1997; Hammond *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2006).

Existem evidências de que a enzima GPAM controla a taxa de incorporação de ácidos gordos na síntese de triglicéridos (TGA), sendo estes um dos componentes essenciais do leite. A enzima cataliza o primeiro passo na bio-síntese de triglicéridos por meio de acilação do glicerol-3-fosfato na posição sn-1 para produzir ácido lisofosfatídico. Este ácido, sintetizado na membrana externa da mitocôndria, pode ser mantido na mitocôndria para ser convertido em cardiolipina ou pode ser transportado para o retículo endoplasmático, onde se localizam as enzimas terminais da síntese de triglicéridos e a maioria das enzimas para a síntese de glicerofosfolípidos. Desta forma a GPAM contribui para a síntese “de novo” de triglicéridos, processo biológico em que também participa a outra isoforma da enzima (Bell e Coleman, 1980; Ericsson *et al.*, 1997; Balija *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2002; Onorato *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2006).

O gene da enzima GPAM que, no nosso estudo, permitiu verificar uma expressão diferencial na glândula mamária de ovelhas produtoras de leite face a não produtoras foi localizado no cromossoma 10q25,2 do homem (*Homo sapiens*), no cromossoma 10 do chimpanzé (*Pan troglodytes*) e no cromossoma 1q55 de ratazana

(*Rattus norvegicus*). Em rato (*Mus musculus*) encontra-se no cromossoma 19 à distância de 52,0 cM e foi observado no cromossoma 26 da vaca (*Bos taurus*) e no cromossoma 16 no porco (*Sus scrofa*). No entanto, ainda não foi identificado no genoma da ovelha (*Ovis aries*) (Welch *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 2002; Tomas *et al.*, 2003; <http://www.informatics.jax.org/>).

O grupo de Roy *et al.* (2006) estudou a estrutura genética e uma transcrição alternativa da GPAM nos bovinos, dado que a localização do GPAM se encontra numa região do cromossoma onde surgem diferentes *Quantitative Trait Loci* (QTLs) que afectam a produção de leite, de gordura e de proteína. Estes autores afirmam, também, baseando-se na localização QTL, que o gene que codifica para a GPAM poderia ser considerado como bom-candidato para os caracteres referidos.

A GPAM foi purificada e o seu cDNA clonado, o que permitiu melhorar o conhecimento da enzima. Sabe-se que é um proteína de 827 aminoácidos e que a comparação da sua sequência com a de outras aciltransferases evidencia quatro regiões de forte homologia que contêm a sequência-assinatura das glicero-lípidos aciltransferases (Hammond *et al.*, 2002; Coleman e Lee, 2004).

Estudos realizados parecem indicar que a GPAM é regulada pela nutrição (alimentação e jejum) e por hormonas (insulina e factor de crescimento epidermal), de tal forma que a regulação hormonal da GPAT se realiza provavelmente a nível da transcrição. Também se observou em diferentes estudos a possível existência de outros mecanismos de regulação, como a fosforilação ou a desfosforilação, que podem afectar a actividade desta enzima (Sul e Wang, 1998; Welch *et al.*, 1998; Dircks *et al.*, 1999; Onorato e Haldar, 2002; Hammond *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2006).

É importante recordar que os ácidos gordos nos triglicéridos do leite provêm da circulação sanguínea e da síntese “de novo” na glândula mamária. Em vacas leiteiras, uma dieta rica em hidratos de carbono facilmente fermentáveis e pobre em fibras origina uma diminuição na gordura do leite, proveniente das duas fontes. Em animais alimentados com esta dieta, a quantidade de mRNA proveniente dos genes implicados na síntese de gordura na glândula mamária, como a GPAT, foi afectada de maneira consistente com a redução da gordura do leite (Peterson *et al.*, 2003). Nos tecidos em que se observa a presença das duas isoformas da GPAT parece existir uma associação entre o aumento da síntese de triglicéridos e da actividade destas enzimas GPAT. No

entanto, observa-se frequentemente um acréscimo mais significativo da forma GPAT microsomal (Sul e Wang, 1998; Coleman *et al.*, 2000).

Com o objectivo de determinar os mecanismos pelos quais a alimentação com ácidos linoleico conjugados (CLA), *trans*-10 e *cis*-12 CLA reduzem a síntese de gordura do leite em vacas leiteiras, foi realizada uma experiência pela qual foram introduzidas no abomaso infusões com estes ácidos. Foi possível observar que depois de cinco dias de infusão com os CLA ocorreu uma redução da expressão de mRNA das enzimas essenciais para a síntese de gordura do leite na glândula mamária, observando-se uma diminuição de 42% nas GPAT. Os CLA reduzem a síntese de gordura no leite por duas vias de síntese, mas afectam mais a proveniente da síntese “de novo”. Os dados ressaltam uma forte coordenação desta regulação, embora ainda não tenham sido revelados para o mundo da ciência (Baumgard *et al.*, 2002).

O desenvolvimento da síntese de ácidos gordos pela glândula mamária na proximidade do parto é uma parte integral da lactogénese e as hormonas necessárias para a síntese de ácidos gordos parecem ser as mesmas para a lactogénese e para a lactação em geral. Diferentes estudos demonstraram a necessidade de uma combinação de insulina, glucocorticóides e prolactina para permitir a síntese de ácidos gordos na ratazana, no rato, no coelho, na cabra, na vaca e em búfalo de água (Mayer, 1978; Skarda *et al.*, 1978; Collier *et al.*, 1977; Bhatia *et al.*, 1979; Vernon *et al.*, 1983).

O estudo realizado por Vernon *et al.* (1987) teve como objectivo determinar o efeito da lactação na actividade de várias enzimas, entre as quais se encontram as duas isoformas da GPAT, em diversos tecidos ovinos, sendo um deles o parênquima mamário de ovelhas. No estudo observou-se que a actividade desta enzima durante a lactação é tão elevada que faz parecer pequenas as alterações verificadas nos tecidos adiposo peri-renal e subcutâneo, músculo esquelético, fígado e córtex do rim. Estes autores observaram que as ovelhas por eles estudadas provavelmente utilizariam esta enzima com uma eficiência de 50 a 60%, dado que mediram uma taxa de secreção de gordura no leite de aproximadamente 250 g/dia. Este ritmo de secreção corresponde a uma taxa de esterificação dos ácidos gordos de 700 a 900 mol/minuto por ovelha, dos quais dois terços provêm da esterificação pela enzima GPAT na glândula mamária. Da actividade total da GPAT medida na glândula mamária, foi estimado que aproximadamente 18% correspondeu à GPAM e a restante à outra isoforma.

Os nossos resultados parecem indicar que na glândula mamária de ovelhas adultas na fase seca não se expressa o gene da GPAM, de forma que possa ser detectada pela técnica de Northern blot. No trabalho realizado por Vernon *et al.* (1987), não se estudou a actividade da GPAT na glândula mamária em ovelhas não lactentes, mas é de supor que quando a glândula mamária não produz leite os níveis desta enzima sejam baixos. Desta forma, os nossos resultados estão de acordo com a bibliografia consultada.

Por outro lado, quando utilizada a técnica semiquantitativa de Northern blot não foram observadas diferenças significativas entre as nossas ovelhas de elevada e de baixa produção, podendo isto dever-se ao baixo número de animais em estudo por grupo (n=3), mas também à relativamente pequena diferença na quantidade de leite produzido pelos animais de elevada e de baixa produção. Além disso, a técnica de Northern blot pode não ser a mais indicada para detectar pequenas diferenças entre os grupos de animais em estudo.

A análise do gel obtido por DD pareceu indicar uma diferença de expressão do RNA mitocondrial, concretamente na região codificante da subunidade 5 da NADH desidrogenase (banda 9), na glândula mamária de ovelhas de maior produção de leite face aos restantes grupos de animais em estudo. No entanto, os dados obtidos empregando Northern blot não confirmaram estes resultados, uma vez que se verificou a expressão em todos os animais produtores de leite. A técnica Northern blot permitiu observar que este gene se expressa na glândula mamária de ovelhas lactentes e que, embora de uma forma muito escassa, se observa a sua expressão na glândula mamária de ovelhas secas, não expressando em fibroblastos fetais.

Os resultados de Northern blot estão de acordo com o esperado porque, como antes se assinalou, devido à influência hormonal durante a transição para a lactação, tem lugar um grande crescimento e desenvolvimento dos tecidos da glândula mamária. Desta forma, a população de células alveolares que emerge depois da diferenciação apresenta uma elevada capacidade para o metabolismo oxidativo. O aumento do metabolismo oxidativo que é necessário para cobrir a vasta necessidade de energia da lactação é obviamente devido ao aumento da função mitocondrial. Estes estados de desenvolvimento são, portanto, períodos activos de replicação e de expansão das mitocôndrias, observando-se um grande aumento da actividade enzimática (Rosano e

Jones, 1976a; Dreels e Baumrucker, 1982; Akers, 2002).

Também outros autores como Suchyta *et al.*, 2003 compararam a expressão de genes na glândula mamária de bovinos em período lactente e não lactente obtendo também diferenças em genes que regulam o metabolismo energético. Idênticos resultados foram obtidos em estudos com ratas (Rudolph *et al.*, 2003; Clarkson *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2006; Ron *et al.*, 2007).

No período entre a gestação e a lactação existe um aumento da quantidade da membrana interna da mitocôndria (várias enzimas essenciais) e de material da matriz (ciclo de Krebs, transporte de electrões e fosforilação oxidativa). Estas alterações que se produzem na estrutura da mitocôndria têm origem na resposta à maior necessidade de energia da lactação (Rosano e Jones, 1976a). Acompanhando o aumento da actividade da membrana interna das mitocôndrias existe um aumento equivalente no total de proteína. Este facto deve-se não só ao aumento selectivo das enzimas individualmente, mas também a um desenvolvimento geral da mitocôndria (Tobon e Salazar, 1975; Rosano e Jones, 1976b; Akers, 2002).

O controlo genético da mitocôndria é levado a cabo tanto pelo DNA nuclear como pelo mitocondrial (mtDNA), que em conjunto contribuem para a estrutura e para o funcionamento deste organelo (Tzagoloff, 1982; Weiss, 1991). A ausência de recombinação e a sua suposta herança materna converte o DNA mitocondrial num bom candidato para os estudos de filogenia materna. As variabilidades nas contribuições genéticas para as enzimas das mitocôndrias são susceptíveis de originar alterações na função respiratória, o que, conseqüentemente, poderia produzir diferenças na eficiência da síntese de energia (Lindberg *et al.*, 1989).

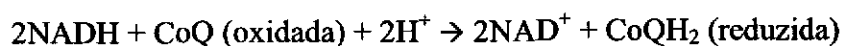
O genoma completo da mitocôndria da ovelha (*Ovis aries*) é constituído por 16 620 bp de DNA circular. A sequência de mitocôndria detectada por DD (117 bp) que se expressa de forma diferencial entre os animais em estudo é 100% complementar da parte da sequência que codifica a subunidade 5 do NADH desidrogenase (11756..13576 bp, comprimento 606 bp) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>).

A mitocôndria promove a oxidação do NADH e do FADH<sub>2</sub>, produzidos nas reacções de glicólise, do ciclo de Krebs, de  $\beta$ -oxidação e de oxidação de alguns aminoácidos. A transferência de electrões do NADH e do FADH para o O<sub>2</sub> realiza-se numa sequência de reacções de oxigenação num processo designado por cadeia



respiratória ou cadeia transportadora de electrões. Esta cadeia consiste numa série de transportadores de electrões que operam de forma sequencial, formadas por proteínas integrais da membrana associadas a grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar electrões. Os electrões passam através dessa cadeia de um nível de energia mais alto para um nível de energia mais baixo o que permite libertar energia suficiente para sintetizar ATP a partir do ADP e do  $P_i$  por meio da fosforilação oxidativa (Weiss, 1991; Berg *et al.*, 2002).

Os vários componentes da cadeia transportadora de electrões localizam-se na membrana interna da mitocôndria por onde os electrões provenientes do NADH e do  $FADH_2$  flúem para o oxigénio molecular. Existem vários transportadores de electrões que funcionam em complexos multienzimáticos, sendo o primeiro o complexo NADH desidrogenase (E.C. 1.6.5.3). Este, também designado por NADH coenzima Q reductase, é o complexo I da cadeia mitocondrial de transferência de electrões, que cataliza a transferência de electrões do NADH para a coenzima Q (CoQ):



A NADH desidrogenase constitui o maior complexo respiratório, de tal forma que a enzima nos mamíferos contém 45 subunidades proteicas separadas, das quais sete são codificadas pelo genoma da mitocôndria (Weiss, 1991; Berg *et al.*, 2002; Lazarou *et al.*, 2007).

A NADH desidrogenase apresenta uma estrutura em forma de “L” com o braço horizontal dentro da membrana e o braço vertical projectado na matriz (Berg *et al.*, 2002).

A reacção catalizada por esta enzima envolve vários passos intermediários que ainda não foram completamente esclarecidos. Esta enzima promove a transferência de dois electrões do NADH para o grupo prostético da flavina mononucleotideo (FMN) dando origem à forma reduzida da  $FMNH_2$ . Os electrões são depois transferidos da  $FMNH_2$  para uma série de centros ferro-enxofre (FeS) que constituem o segundo grupo prostético da enzima NADH desidrogenase. Os centros podem consistir de dois a quatro átomos de ferro complexado com igual número de iões sulfeto ( $2\text{Fe-2S}$  ou  $4\text{Fe-4S}$ ), mediando a transferência de um electrão. Os electrões do grupo ferro-enxofre são então transferidos para a coenzima Q. Como resultado da transferência de dois electrões do NADH para a coenzima Q (ubiquinona) através da NADH desidrogenase origina a

transferência de quatro prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. Os restantes transportadores de electrões designam-se por succinato-coenzima Q oxidoreductase (complexo II), coenzima Q- citocromo c oxidoreductase (complexo III) e citocromo c oxidase (complexo IV) (Berg *et al.*, 2002).

Embora, na bibliografia consultada não se tenha encontrado referências directas a um aumento da actividade da NADH desidrogenase subunidade 5 (cDNA mitocondrial) na glândula mamária de animais lactentes, foi referido que na glândula mamária de animais lactentes ocorre um aumento do número e da actividade das mitocôndrias, já que estas são a “máquina produtora” de energia biológica. De esta forma não é surpreendente que os resultados obtidos utilizando a técnica de Northern blot permitam observar diferenças de hibridação significativas entre ovelhas produtoras de leite e não produtoras, quando foi utilizada como sonda parte da sequência codificante da NADH desidrogenase subunidade 5 (cDNA mitocondrial).

No nosso estudo, não se observou uma diferença estatisticamente significativa na expressão de NADH desidrogenase subunidade 5 em ovelhas de elevada e de baixa produção de leite. Esta falta de diferenças poderia ser devida, em parte, ao pequeno número de animais em estudo por grupo ( $n=3$ ). Por outra parte, é conveniente assinalar que a diferença entre a quantidade de leite produzida pelos animais considerados como de elevada e de baixa produção é relativamente pequena, o que poderia contribuir em certa medida para que a expressão diferencial não se tenha evidenciado da forma esperada. Também a técnica de Northern blot utilizada para a confirmação é considerada uma técnica semiquantitativa e talvez não permita averiguar pequenas diferenças na expressão de genes, como poderia ocorrer no nosso estudo.

Os nossos resultados parecem indicar a probabilidade da existência da expressão, embora pouco intensa, de uma sequência de mRNA parcial similar ao domínio de tetramerização 3 do canal de potássio (banda 10) quando as ovelhas produzem leite. Os canais de potássio são proteínas integradas na membrana plasmática da maioria das células em todas as formas celulares (Shealy *et al.*, 2003).

A glândula mamária é essencialmente um epitélio de secreção que transporta de forma vectorial uma grande quantidade de solutos, tais como lactose,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , assim como outros compostos, como as proteínas de leite e gorduras (Shennan e Gow, 2000). Nos bovinos, a secreção do  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  determina aproximadamente 40% da

força impulsora, sendo a restante determinada pela lactose. Os iões monovalentes e a lactose são segregados no lúmen da glândula mamária principalmente por meio de vesículas. Dado que a membrana apical das células epiteliais contém canais de  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Cl^-$ , provavelmente de tipo não selectivo, é possível que exista um contacto directo entre os iões monovalentes dentro das células epiteliais e o fluido armazenado no lúmen da glândula. Foi observado que os canais de iões presentes na membrana apical das células epiteliais mamárias exibem também funções de regulação na secreção de leite, dado que se demonstrou que a inibição destes canais reduz a secreção de lactose e de iões monovalentes no lúmen da glândula, originando uma diminuição do volume de leite (Silanikove *et al.*, 2000).

Os processos de captação de substratos e de síntese de determinados componentes do leite, assim como a secreção dos mesmos podem originar alterações no volume celular. As células necessitam de manter o volume dentro de determinados limites para sobreviver. O fluxo de  $K^+$  pode ajudar na regulação do metabolismo da glândula mamária, devido a que a síntese de proteínas do leite está sob o controlo do estado de hidratação celular (Shennan e Thomson, 2004). Os resultados observados por Shennan e Gow (2000) em tecidos de glândula mamária de ratas lactentes permitem chegar à suposição da existência de canais de potássio activados pelo volume. O fluxo de potássio activado pelo volume desenvolve uma função central na regulação do volume celular da glândula mamária. A síntese de proteínas na glândula mamária está afectada pelo estado de hidratação. Desta forma, a tumefacção ou a desidratação celular aumentam e diminuem, respectivamente, a síntese de proteínas. Neste mesmo sentido, o controle de outros processos metabólicos como a síntese de gordura e de glucogénio são também sensíveis ao estado de hidratação celular. O volume celular parece também afectar a secreção de hormonas, a proliferação celular, os processos de apoptose e a migração celular (Shennan e Thomson, 2004).

Os nossos resultados parecem estar de acordo com o observado na bibliografia (Shennan e Gow, 2000; Silanikove *et al.*, 2000; Shennan e Thomson, 2004), dado que também se verificou que os canais de potássio poderiam, de alguma maneira, regular o volume celular da glândula mamária em lactação e, em menor extensão, também participar na secreção de leite.

Como antes referiu, a glândula mamária desenvolve-se em diversos períodos,

que vão desde o embrionário à puberdade, à gestação e à lactação, sofrendo uma regressão durante a lactação. Neste estado, a progenitora produz leite, sendo este a fonte principal de nutrição para o recém-nascido, fornecendo-lhe proteínas, minerais, hidratos de carbono, ácidos gordos, factores de crescimento, moduladores imunológicos, etc.. Embora se tenham identificado caseínas em todos os mamíferos, nos *eutheriam* constituem o maior grupo de proteínas do leite, indo até aos 75% no caso dos ruminantes (Rijnkels, 2002; Sørensen *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004).

Estudos com microarrays de DNA realizados na glândula mamária de ratas permitiram observar que no período da lactação se expressam predominantemente os genes que codificam proteínas do leite, aumentando a expressão durante a gestação (Lemkin *et al.*, 2000; Rudolph *et al.*, 2003).

Os nossos resultados pareceram indicar uma expressão diferencial nas caseínas ( $\alpha$ -S2,  $\beta$  e  $\alpha$ -S1) (bandas 11, 12 e 13), entre a glândula mamária de ovelhas que produzem leite, face a não produtoras. Tal facto parece confirmado pela técnica de Northern blot, mas não pareceu indicar diferenças significativas entre animais de elevada e de baixa produção.

Também no estudo realizado por Suchyta *et al.*, 2003 em que foi comparada a expressão de genes da glândula mamária de vacas em período lactente e não lactente obtém tal como nós diferenças na expressão dos genes das proteínas do leite. As caseínas ( $\alpha$ -s1- e  $\beta$ ) encontram-se entre as que apresentam uma maior expressão em animais lactentes comparativamente com não lactentes (Suchyta *et al.*, 2003). No entanto, segundo o estudo de Park *et al.*, (2007) o leite de ovelha apresenta em média maior concentração das caseínas ( $\alpha$ -s2- e  $\beta$ ) mas também da caseína ( $\alpha$ -s1).

No leite dos ruminantes, as caseínas interactuam com o fosfato de cálcio, formando grandes partículas colóides designadas por micelas. Estes complexos de micelas tornam possível manter uma concentração de fosfato de cálcio muito elevada no leite, de forma a prover aos recém-nascidos este elemento essencial para a mineralização dos tecidos calcificados que estão em rápido crescimento. As micelas do leite de ovelha, tal como as do leite de cabra apresentam uma mineralização média mais elevada do que as do leite de vaca (Sørensen *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2007). Também se pensa que as micelas de caseína exercem uma função biológica vital ao proteger a glândula mamária contra a calcificação, uma vez que sequestram uma concentração

elevada de fosfato de cálcio (Little e Holt, 2004). As caseínas podem-se dividir em dois grupos, consoante a sua solubilidade em cálcio. Assim, três caseínas ( $\beta$ ,  $\alpha$ -S1 e  $\alpha$ -S2) não são solúveis em cálcio, enquanto a  $\kappa$ -caseína é solúvel em cálcio (Farrell *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas tem-se determinado as sequências de DNA genómico e de cDNA dos genes de caseínas de muitas espécies. Foi observado, dependendo da espécie, três a quatro genes relacionados entre si na forma de evolução. Estes genes são também designados por caseínas sensíveis ao cálcio: a  $\alpha$ -s1-caseína (CSN1S1 o *Csna*), a  $\beta$  (CSN2 o *Csnb*), a  $\alpha$ -s2 (CSN2S2, A e B, o *Csng* e *Csnd*) e o gene da  $\kappa$ -caseína (CSN3 ou *Cnsk*), que lhes está física e funcionalmente ligado (Rijnkels, 2002).

Nas ovelhas, nos bovinos e nas cabras (artiodáctilos) não se encontra a  $\alpha$ -s2-caseínaA, apresentando três genes antes assinalados para a codificação das caseínas.

Por seu lado, o homem, o coelho, o rato e a ratazana apresentam os quatro genes, uma vez que além dos genes que existem nos animais do grupo anterior também se distingue a presença da caseína  $\alpha$ -s2A (Rijnkels, 2002).

O gene da  $\alpha$ -s1-caseína localiza-se no cromossoma 4q21,1 do homem (*Homo sapiens*). No rato (*Mus musculus*) encontra-se no 5 à distância de 44,9 cM, no cromossoma 14p21 da ratazana (*Rattus norvegicus*), enquanto no porco (*Sus scrofa*) foi localizado no cromossoma 8. Este gene foi detectado no cromossoma 6q26-33 da vaca (*Bos taurus*), e também no cromossoma 6 da ovelha (*Ovis aries*). Neste animal o gene apresenta 18 exões, o mRNA tem o comprimento de 1 110 bp e a proteína 206 aminoácidos (Ferranti *et al.*, 1995; Ceriotti *et al.*, 2004; <http://www.informatics.jax.org/>).

Foi determinada a localização da  $\beta$ -caseína no cromossoma 4q21,1 dos humanos (*Homo sapiens*), no cromossoma 5 à distância de 44,91 cM do rato (*Mus musculus*) e no cromossoma 14p21 da ratazana (*Rattus norvegicus*), enquanto no porco (*Sus scrofa*) foi encontrado no cromossoma 8. Na vaca (*Bos taurus*) este gene foi encontrado no cromossoma 6q31-33 e por seu lado foi também localizado no cromossoma 6 no braço q à distância de 22-31 cM na ovelha (*Ovis aries*). Nesta espécie, tal como na maior parte dos animais estudados, o gene da  $\beta$ -caseína apresenta nove exões (Rijnkels, 2002; <http://www.informatics.jax.org/>).

Por seu lado, a  $\alpha$ -s2-caseínaA localiza-se no cromossoma 4q21,1 do homem

(*Homo sapiens*) e no rato (*Mus musculus*) a variante csnd ortóloga à  $\alpha$ -s2-caseínaB foi descoberta no cromossoma 5 à distância de 44,94 cM, e na ratazana (*Rattus norvegicus*) no cromossoma 14p21. Nos artiodáctilos que unicamente apresentam o gene  $\alpha$ -s2B, como a vaca (*Bos taurus*), foi encontrado no cromossoma 6q31, enquanto na cabra (*Capra hircus*) no 4 e em ovelhas (*Ovis aries*) no 6. Sabe-se que o gene da  $\alpha$ -s2-caseínaB contém, na ovelha, 18 exões (Groenen *et al.*, 1993; <http://www.informatics.jax.org/>).

Foi sugerida na ovelha Churra a existência de um QTL no telómero do cromossoma 6 próximo da região dos genes que codificam as caseínas. Duas famílias com diferentes funções são segregadas nesta região – uma para a percentagem da proteína e outra para a produção de leite. Tal como o descrito nos bovinos, a primeira família de segregação origina a diluição da concentração do leite (Georges *et al.*, 1995; Spelman *et al.*, 1996; Barillet *et al.*, 2005). Pelo contrário, a segunda demonstra um efeito pleiotrópico na produção de leite e de proteína, como é referido por Kühn *et al.* (1999), noutra cromossoma de bovinos (Barillet *et al.*, 2005).

O *cluster* dos genes das caseínas encontra-se numa região de 250 a 350 kb, dependendo da espécie, sendo muito rico em AT (menos de 37% de GC) e apresentando um conteúdo de repetições abaixo da média (Rijnkels, 2002). A organização e a orientação dos genes nos *clusters* em todas as espécies estudadas até à data permitem observar que é altamente conservada (Pauloin *et al.*, 2002).

A conservação observada nos genes ortólogos da caseína ocorre principalmente nas regiões 5' e 3' UTRs, no sinal peptídico e nos maiores sítios de fosforilação (P-sites). Em todos os genes das caseínas o primeiro exão codifica a região 5'UTR (Mercier e Vilotte, 1993; Rijnkels, 2002).

O facto de actualmente todos os mamíferos apresentarem caseínas sensíveis ao cálcio e caseínas do tipo  $\kappa$ , indica que o gene ancestral emergiu antes da radiação dos mamíferos (há mais de 300 milhões de anos). Existem teorias segundo as quais as caseínas sensíveis ao cálcio evoluíram a partir de um gene ancestral por duplicação de exões. O gene ancestral terá contido ou recrutado os exões que codificam os elementos necessários para a secreção da proteína, para que esta possa ser fonte de nutrientes e de minerais (Jones *et al.*, 1985; Rijnkels, 2002).

Dos genes de caseína sensíveis ao cálcio, a estrutura da  $\beta$ -caseína é a mais

conservada entre ortólogos. Em contraste com os genes de  $\alpha$ -s1-caseína e de  $\alpha$ -s2-caseína, o da CSN2 não parece ter sofrido grandes duplicações ou outras reorganizações, sendo unicamente observadas algumas modificações nos nucleótidos. Uma das razões para a elevada conservação da estrutura da  $\beta$ -caseína poderá ficar a dever-se à orientação deste gene, que é oposta à das outras caseínas sensíveis ao cálcio, e a todos os genes da região. Por isso pensa-se que o gene da  $\beta$ -caseína é o que poderá ser mais parecido com o gene ancestral das caseínas (Rijnkels, 2002).

As duplicações que originaram o gene da  $\alpha$ -s1-caseína ocorreram antes da duplicação que deu origem aos genes da  $\alpha$ -s2-caseína. O facto de os genes da  $\alpha$ -s2-caseína apresentarem duplicações internas mais reconhecíveis indica uma origem mais recente e também suportam uma relação mais próxima entre estes genes e o da  $\beta$ -caseína (Bonsing e Mackinlay, 1987; Rijnkels, 2002).

O alinhamento do gene da  $\alpha$ -s1-caseína em todas as espécies estudadas permitiu observar uma grande homologia no nível de organização dos genes, sendo praticamente idênticos o número e o tamanho dos exões. As variações no mRNA e na proteína devem-se principalmente ao fenómeno de maturação (*splicing*) alternativo, a duplicações e a inserções/delecções além da substituição de nucleótidos (Rijnkels, 2002; Moioli *et al.*, 2007).

A maturação de exões é um fenómeno comum nos genes das caseínas. Nos ruminantes foi observado no gene da  $\alpha$ -s1-caseína o fenómeno de delecção alternativa de não alelos. Também existem estudos que permitem distinguir variantes deste gene resultantes da maturação alternativa dos exões 9-11 em cabra e em ovelha (Leroux *et al.*, 1992; Ferranti *et al.*, 1997).

A análise comparativa do *cluster* de caseínas em rato, em ratazana e no homem permitiu identificar os genes  $\alpha$ -s2 numa posição conservada entre espécies, enquanto o *cluster* de bovinos unicamente permitiu observar um único gene. Um dos dois genes de caseína no homem,  $\alpha$ -s2-caseínaA, demonstrou homologia com o gene de caseína  $\gamma$  dos roedores e com o gene da  $\alpha$ -s2-caseínaA do coelho. O outro gene,  $\alpha$ -s2-caseínaA, é ortólogo com o gene de caseína  $\delta$  em roedores e com o gene da  $\alpha$ -s2-caseínaA de coelho (Rijnkels, 2002; <http://www.informatics.jax.org/>).

O alinhamento dos exões dos genes da  $\alpha$ -s2-caseína de humanos, de bovinos e de roedores indica que a estrutura está bem conservada, não obstante a duplicação dos



genes. A presença da maioria dos exões em todas as espécies estudadas é indicativo de que a duplicação do gene ancestral da  $\alpha$ -s2-caseína ocorreu antes da radiação dos artiodáctilos e dos ruminantes. Esta teoria é apoiada pela análise filogenética do cDNA dos genes de  $\alpha$ -s2-caseína em humano, rato, ratazana, coelho, bovino, porco e camelo (Rijnkels, 2002).

A presença de um único gene nos artiodáctilos (e provavelmente noutras espécies) aumenta a pressão selectiva para a utilização da maioria dos exões do gene da  $\alpha$ -s2-caseína, enquanto a duplicação de genes (primatas, roedores e coelhos) torna possível a diversidade, provavelmente exercendo funções diferentes. Foi sugerido que a duplicação de genes e de exões, combinada com a maturação alternativa, poderá ser o principal caminho para a diversificação funcional na evolução (Kondrashov e Koonin, 2001).

Como antes se fez referência, durante o ciclo de vida de um mamífero a glândula mamária desenvolve-se em fases diferentes. O estado de lactação caracteriza-se pela expressão de proteínas do leite, sendo que a maioria são caseínas. Tanto o desenvolvimento da glândula mamária como a lactação estão regulados por várias hormonas, como hormonas peptídicas, esteróides e modeladores de crescimento. A prolactina, os glucocorticóides e a insulina exercem uma função principal na acumulação do mRNA das proteínas do leite (Juergens *et al.*, 1965; Rosen *et al.*, 1999; Gallego *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2004).

A hormona peptídica prolactina segregada pela hipófise, para além de exercer uma acção na diferenciação morfológica e bioquímica das células epiteliais, regula a síntese de proteínas de leite durante a lactação (Groner, 2002). O mecanismo principal pelo qual a prolactina activa a transcrição dos genes responsáveis pela síntese de proteínas do leite utiliza uma rota biológica que se activa pela dimerização do receptor (PrIR), assim como a activação da proteína tirosina-quinase Jak2 (*Janus activated kinase 2*) e a fosforilação deslocam para o núcleo o sinal de tradução e o activador de transcrição 5 (Stat5), que se liga especificamente com o promotor dos genes-alvo, como é caso do gene da  $\beta$ -caseína (Groner, 2002; Choi *et al.*, 2004; Zoubiane *et al.*, 2004).

Embora o mecanismo principal de activação da prolactina seja o de PrIR-Jak2-Stat5, também existem outros factores de transcrição, como o C/EBP, o NF, o YYI e outros ainda menos estudados (Groner, 2002).

O Stat5, embora não se expresse exclusivamente na glândula mamária, foi pela primeira vez identificado neste tecido como uma proteína capaz de se ligar ao DNA. Foram identificados dois *clusters* de genes Stat5 – o Stat5a e o Stat5b –, que apresentam uma homologia de 90% e que provavelmente surgiram por duplicação de genes (Groner, 2002). Existem publicações em que se pode ler que o Stat5a é essencial para a diferenciação celular induzida pela prolactina e para a expressão das proteínas do leite (Yamashita *et al.*, 2001). Mas parece também existir uma relação entre a localização nuclear do Sta5b nas células epiteliais mamárias em lactação e a presença de mRNA de genes que codificam proteínas durante a lactação e o início da involução (Molenaar *et al.*, 2000).

Na sinalização dos glucocorticóides ocorre a ligação destes aos receptores GR, resultando no recrutamento de elementos de resposta (GRE) que modulam a transcrição dos genes-alvo (Wittlin *et al.*, 2003).

Embora a prolactina e as hormonas glucocorticóides exerçam as rotas biológicas de forma independente, nas células epiteliais mamárias a expressão dos genes das proteínas do leite necessita tanto dos glucocorticóides como da prolactina. Foi recentemente demonstrado que o Stat5 e o GR interactuam entre si, influenciando a transcrição tanto de forma sinérgica como para a fazer regredir (Cella *et al.* 1998; Stoecklin *et al.*, 1999; Wittlin *et al.*, 2003). O Stat5 e o receptor de glucocorticóides cooperam na transcrição do promotor do gene da  $\beta$ -caseína e de outras proteínas do leite (Groner, 2002; Kingsley-Kallesen *et al.*, 2002).

No caso da  $\beta$ -caseína, foi demonstrado que o GR actua como activador da transcrição para o Stat5, aumentando e prolongando o ligamento ao DNA do Stat5, promovendo o domínio de activação da transcrição e facilitando a interacção com outros factores de transcrição e com moléculas co-reguladoras (Kingsley-Kallesen *et al.*, 2002). Os lugares de ligação de DNA também parecem ser importantes para a cooperação do GR e do Stat5. Mutações no lugar de ligação do Stat5 ao promotor próximo de  $\beta$ -caseína inibem a transcrição de genes induzidos por glucocorticóides e PRL-R (Kingsley-Kallesen *et al.*, 2002).

Existe a hipótese de que o Stat5 seja utilizado como um ponto comum nas rotas biológicas de sinalização de vários estímulos extracelulares depois de estes terem tradução intracelular. Pensa-se que o Stat5 poderá representar parte de uma rota comum

pela qual diferentes sinais extracelulares são traduzidos nas células mamárias (Yang *et al.*, 2000a).

Desde 1965, tem-se conhecimento de que a prolactina actua de forma sinérgica com a insulina e com a hidrocortisona, induzindo a síntese de caseínas em explantes mamários (Juergens *et al.*, 1965). Mas mais tarde foi publicado que a prolactina, a hidrocortisona e a insulina são necessárias para a máxima acumulação de mRNA codificado pelo gene de  $\beta$ -caseína em roedores e em ruminantes, e que a hidrocortisona, por si só, não é capaz de induzir a síntese de mRNA em culturas de células de glândula mamária ou em vivo (Devinoy *et al.*, 1978; Chomczynski *et al.*, 1984; Matusik e Rosen, 1980; Topper e Freeman 1980; McFadden *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 2000a).

A prolactina, em associação com a insulina e com a hidrocortisona, regula a taxa de transcrição e a estabilidade do mRNA da  $\beta$ -caseína em culturas de células de glândula mamária (Yang *et al.*, 2000a).

O estudo de células de glândula mamária (*in vitro*) demonstrou que a hormona do crescimento (GH) funciona de forma semelhante à prolactina, aumentando os níveis de mRNA codificado pelo gene de  $\beta$ -caseína. Embora sejam necessários mais estudos, existe a hipótese de que a GH medeia os aumentos do nível de mRNA das caseínas por meio da regulação da degradação do mRNA, assim como se pensa que esta hormona previne a involução da glândula mamária (Yang *et al.*, 2000a). Também parece provável que os níveis de mRNA de  $\beta$ -caseína estejam sob a influência do ambiente local nos quartos do úbere dos bovinos, uma vez que foi observado que a actividade de Stat5 varia localmente, em resposta a diferentes frequências de ordenha (Yang *et al.*, 2000b).

Existem evidências de que alguns genes que se expressam na lactação poderão ser também regulados a nível da transcrição. Especula-se que a síntese destas proteínas está regulada pela estabilidade do mRNA, como é caso das caseínas, em que a estabilidade do mRNA se deve a um aumento da cauda de poli(A). Foi descoberto que a cauda de poli(A) do mRNA codificado pelos genes da  $\beta$  e  $\delta$ -caseína de ratas é mais pequena quando cessa a amamentação, mas que aumenta quando esta é novamente permitida (Choi *et al.*, 2004).

Existe o conhecimento de que a hormona oxitocina ajuda à ejeção do leite por meio da contracção de células mioepiteliais. Mas existem evidências de que a

oxicitocina, além desta função, acelera a transferência intracelular de caseínas que são expulsas no leite (Lollivier *et al.*, 2006).

A adesão da prolactina a receptores transmembranares na matriz extracelular (ECM) modula a rota biológica de sinalização desta hormona, regulando assim a transcrição e a diferenciação das proteínas do leite (Zoubiane *et al.*, 2004).

Embora não esteja de todo compreendido o mecanismo de “conversação” entre os receptores transmembranares na matriz extracelular e a resposta da prolactina, sabe-se que implicam os receptores da membrana plasmática tradutores dos sinais da ECM à estrutura do citoesqueleto, designados por integrinas. Estas apresentam a capacidade de influenciar os processos celulares de forma directa por meio de enzimas de sinalização e, indirectamente, por intermédio do citoesqueleto constituído por actina (Zoubiane *et al.*, 2004).

Os microfilamentos de actina e os microtubos são responsáveis pela arquitectura do citoesqueleto. Esta é organizada de forma diferencial em células mamárias capazes de expressar genes das proteínas da leite comparativamente com aquelas que não são aptas para responder à prolactina. Isto sugere que o citoesqueleto pode contribuir para a sinalização da prolactina e, portanto, para a diferenciação celular (Zoubiane *et al.*, 2004).

Também existem vários estudos que indicam a importância do citoesqueleto na manutenção de um nível estável de proteínas do leite em células mamárias (Blum e Wicha, 1988; Seely e Aggeler, 1991). A ruptura do citoesqueleto inibe a síntese da  $\beta$ -caseína, o que faz realçar a necessidade de um citoesqueleto intacto para a síntese de mRNA e de proteína  $\beta$ -caseína, sendo por tanto essencial para a diferenciação completa da glândula mamária (Zoubiane *et al.*, 2004).

Foi descoberto que a ausência da expressão de genes de proteínas do leite que ocorrem depois da rotura dos microfilamentos de actina é devida a uma inibição da actividade do Stat5, já que os microfilamentos estão envolvidos na sinalização mediada que vai desde o PrIR-Jak2 ao Stat5. Assim se conclui que o citoesqueleto está de alguma forma implicado no controlo da transcrição e dependente de ligação a factores de activação (Zoubiane *et al.*, 2004).

Por seu lado, também foi demonstrado que os microtubos são necessários para a síntese de  $\beta$ -caseína e, portanto, para a diferenciação do epitélio mamário. Estes são

necessários para a manutenção dos níveis de receptores da prolactina (Zoubiane *et al.*, 2004).

Foi observado em coelhos que a matriz extracelular (ECM) parece regular a expressão do gene da  $\alpha$ -s1-caseína por meio da modificação local de estrutura da cromatina, de forma independente do Stat5 e das proteínas de ligação aumentadoras (*enhancer binding proteins*) (Jolivet *et al.*, 2005).

Parece assim, que a expressão de proteínas, como as caseínas do leite, é dependente de muitos factores, mas resumidamente parece ser a hormona prolactina e tudo o que se relaciona com a sua rota biológica o que mais influencia a sua expressão. Também foi observado que os glucocorticóides, a insulina e, de forma menos nítida, a hormona do crescimento e a oxitocina parecem influenciar a produção destas proteínas necessárias ao desenvolvimento da descendência.

Por alguma razão, que não podemos apontar com segurança, não foram observadas diferenças significativas na expressão dos genes das caseínas dependentes de cálcio entre ovelhas de raça Churra de elevada e de baixa produção de leite. Embora não tenham sido encontrados na bibliografia estudos parecidos com o nosso, de forma a poder comparar os resultados, este facto poderá dever-se à técnica de Northern blot, que, tal como já se referiu, é semiquantitativa, mas também poderá ser resultante do facto de não existirem grandes diferenças na produção de leite entre os dois grupos de animais produtores e/ou ao baixo número de animais em estudo por grupo (n=3). Recentemente, Barillet *et al.* (2005) e Barillet (2007) sugeriram que o estudo do polimorfismo genético relacionado com as caseínas do leite não é, duma forma geral, recomendado nos esquemas de selecção das ovelhas leiteiras porque ainda não foi possível estabelecer uma relação com as propriedades tecnológicas do leite ou com os caracteres de produção do leite.

A banda candidata 14 visualiza-se de forma mais intensa nas ovelhas secas, mas também se pode perceber, embora com menos intensidade, no animal 6 de baixa produção de leite. Os 245 bp desta banda candidata são homólogos a 129 bp à previsão do mRNA similar à família de carreira de solutos 9 (transportador de sódio/potássio) isoforma 4 (LOC536970) em *Bos taurus*. A realização de Northern blot corrobora os resultados de DD. Assim, esta é a única banda de DD em que se confirmou a regulação positiva dos animais secos, embora se possa observar, mas não de forma nítida, um

pouco de expressão no animal 6 de baixa produção de leite.

Os transportadores de sódio/hidrogénio (NHE) são proteínas integrantes das membranas celulares existentes na maioria, se não em todos, os organismos vivos. Nos mamíferos estes transportadores actuam como mediadores, promovendo a entrada na célula de  $\text{Na}^+$  extracelular e fazendo sair o  $\text{H}^+$  (1Na:1H). Estas proteínas são importantes na regulação de numerosos processos fisiológicos, que vão desde o controlo do pH intracelular e do volume celular ao transporte de electrólitos transepitelial, à iniciação do crescimento e à diferenciação celular em resposta a factores de crescimento e mitogénicos. A actividade dos NHE também facilita o progresso de outros eventos como a adesão, a migração e a proliferação celular (Pizzonia *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001; Orłowski e Grinstein, 2004, 2007; Slepko *et al.*, 2007).

Até agora identificaram-se no genoma humano nove genes NHE (NHE1-2, 3, 4,... 9) distintos e vários pseudogenes. Os loci destes genes designaram-se por Slc9a1, Slc9a2, Slc9a3, Slc9a4, ... Slc9a9, respectivamente (Pathak *et al.*, 1996; de Silva *et al.*, 2003; Orłowski e Grinstein, 2004). Estas isoformas expressam-se de maneira específica em cada tecido ou célula e localizam-se em diferentes membranas (superfície celular ou nas endomembranas dos organelos), implicando-os numa variedade de funções especializadas e essenciais (Orłowski e Grinstein, 2004, 2007).

De todos os transportadores de sódio/potássio, o NHE1, foi o primeiro a ser descrito (Sardet *et al.*, 1989) e é considerado como uma isoforma “housekeeping”. Quanto aos restantes, pensa-se que a distribuição é mais restrita (Anderie *et al.*, 1998; Barr *et al.*, 1998; Bond *et al.*, 1998; Chambrey *et al.*, 2001). O mRNA do NHE4 expressa-se em níveis elevados no estômago, em níveis médios no cólon e no intestino delgado e em níveis baixos no útero, no músculo esquelético, no cérebro e no rim (Wang *et al.*, 1993; Pizzonia *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1998; Chambrey *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Orłowski e Grinstein, 2004; Gawenis *et al.*, 2005). Também foi descrita a expressão do NHE4 no pâncreas de ratazana (Anderie *et al.*, 1998; Roussa *et al.*, 2001) e no ouvido interno (Bond *et al.*, 1998).

No entanto, não surge na bibliografia consultada qualquer referência à expressão do NHE4 na glândula mamária, existindo unicamente referência à activação da expressão do NHE1 em associação com determinados cancros da mama, para além de se ter observado a expressão deste gene em células epiteliais mamárias (Sjaastad *et al.*,

1993; Paradiso *et al.*, 2004). São, assim necessários mais estudos que confirmem se o segmento de cDNA que identificámos é de facto o gene que codifica o NHE4. Se assim for, será preciso aclarar o significado biológico da expressão do NHE4 na glândula mamária em animais não lactentes e porque não se observa a sua expressão em ovelhas produtoras de leite.

A observação do gel de DD faz supor que o mRNA codificado pela proteína putativa de ligação do ácido nucleico (RY-1) (banda 15) se expressa em animais produtores de leite e não em animais em fase não produtiva. A análise BLAST determinou que a sequência da nossa banda candidata (492 bp) é homóloga em 353 bp de 364 bp (96%) com uma sequência similar ao mRNA da proteína putativa de ligação do ácido nucleico (RY-1). No entanto, o NCBI informa que esta sequência de mRNA foi determinada a partir de análise por computador, utilizando um método de previsão, não se conhecendo a sua função biológica, uma vez que foi calculada a partir de uma EST.

Embora, como já se referiu, não se tenha conhecimento da função biológica desta proteína, a sua visualização nítida nos géis de DD em animais produtores de leite face a animais na fase não produtiva, fez com que se optasse por realizar a técnica de Northern blot, a fim de confirmar os resultados obtidos por DD. No entanto, não foi observada hibridação desta sonda (banda 15) nas membranas preparadas para a realização do Northern blot, o que faz supor que esta banda é uma falsa positiva obtida por DD.

Os resultados obtidos no gel de DD fazem supor que receptor  $\alpha$  de estrogénio de ovelha (banda 16) se expressa de forma diferente nos animais produtores de leite, face a animais não produtores. Devido à grande intensidade da banda na maioria dos animais produtores de leite face a não produtores e uma vez que é homóloga ao receptor de estrogénio  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), pareceu-nos interessante confirmar a expressão diferencial. No entanto, não foi possível confirmar a expressão diferencial com a técnica de Northern blot, o que nos parece indicar que a banda candidata é uma falsa positiva obtida com a técnica de DD.

Num estudo realizado em tecido mamário de bovinos, verificou-se uma elevada quantidade de mRNA do ER $\alpha$  durante o período não lactente, observando-se uma



diminuição do nível deste na fase de lactação (Schams *et al.*, 2003). Tendo também em conta que os estrogénios são em parte responsáveis pelo crescimento das células epiteliais mamárias, estando inclusivamente implicados na iniciação da lactação no período anterior ao parto, parece-nos menos plausível que os níveis de mRNA do receptor de estrogénio  $\alpha$  sejam mais elevados nos tecidos de glândula mamária quando esta produz leite, tal como nos parece indicar os resultados de DD (Tucker, 2000; Kaskous *et al.*, 2003a,b; Faulds *et al.*, 2004; Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005; Li *et al.*, 2006).

No gel de DD unicamente foi observada a banda candidata 17 nos animais não lactentes. A banda com 236 bp é homóloga unicamente em 50 bp com a sequência completa do clone RP11-520M5 no cromossoma 4 do DNA genómico dos humanos, cuja função biológica se desconhece. Decidimos comprovar a expressão diferencial desta banda com Northern blot. Uma vez que se repetiu duas vezes em membranas diferentes a hibridação Northern blot com esta sonda e que não foram obtidos resultados de hibridação, partimos do princípio que esta é uma banda falsa positiva, obtida pela técnica de DD.

O gel de DD parece indicar que a sequência conhecida por RNA de ligação da proteína 35A do *Homo sapiens* (banda 18) se expressa em ovelhas produtoras de leite, com maior incidência nas de elevada produção, mas não em adultas enquanto não produzem leite. A bibliografia consultada indica que as proteínas de ligação ao RNA (RBP) parecem ser importantes na regulação da expressão de genes. Sabe-se que estão implicadas no processo de maturação do mRNA e nos mecanismos de regulação que ocorrem depois da transcrição (St. Johnston, 1995). Para isso, ligam-se de forma reversível ao RNA, através de sítios de ligação específica altamente conservados na sequência de aminoácidos designada por “*RNA –recognition motifs*” (RRM). Devido à presença dos RRM, os genes que codificam os RBP são conhecidos como *RNA-binding motif* (RBM) e estão distribuídos por todo o genoma (Salicioni *et al.*, 2000; Martínez-Arribas *et al.*, 2006).

Uma vez que a intensidade da banda é nítida nos animais de elevada produção de leite, um pouco menos intensa nos animais de baixa produção e que não se observa em ovelhas na fase não produtora de leite, além de a função biológica das RBM ser bem conhecida, decidimos corroborar estes resultados com a técnica semiquantitativa de

Northern blot.

No entanto, embora se tenha repetido duas vezes a técnica de Northern blot, não foi possível observar o sinal nas auto-radiografias resultantes da exposição das membranas hibridadas com esta sonda. Uma vez que foi repetido em duas ocasiões diferentes o Northern blot com membranas diversas, pensamos que a falta de sinal se deverá à não hibridação da sonda. Embora a banda candidata 18 pareça ser o que se designa por “falso positivo” resultante da técnica de differential display, também é possível que, devido ao tamanho pequeno da sonda (146 bp), esta não tenha hibridado aquando da realização de Northern blot.

O Northern blot é a técnica mais utilizada para analisar a expressão de mRNA, permitindo determinar a expressão diferencial do mRNA de forma semiquantitativa, comparando a densitometria do sinal da sonda a analisar e a de um controlo que costuma ser um gene “*housekeeping*”. Recebem o nome de genes “*housekeeping*” aqueles que se expressam em todos os tecidos, que se conservam ao largo da evolução e que de uma maneira geral estão presentes em funções metabólicas básicas das células, de tal forma que são responsáveis pelo ciclo celular (Foss *et al.*, 1994). A utilização de um correcto estandar interno é muito importante para a análise quantitativa do RNA (Leeuw *et al.*, 1989).

Embora se pretenda que o controlo interno de RNA apresente uma expressão constante ao largo das condições fisiológicas e experimentais, a expressão destes estandares internos muitas vezes é alterada, pelo que não é possível a sua utilização em muitos estudos rotineiros.

Os genes “*housekeeping*” mais importantes são aqueles que codificam para a  $\beta$ -actina, o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH ou G3PDH), e o RNA ribossómico (rRNA). Em menor medida, também foram utilizadas a albumina e as  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina. Mais recentemente, identificaram-se outros genes, denominados em Inglês como “*maintenance genes*” (Warrington *et al.*, 2000).

É importante recordar que o maior problema para a quantificação da expressão do RNA, tanto no presente estudo como noutros de Northern blot, provém da quantidade de RNA total carregado nos géis de agarose-formaldeído que foram utilizados para a realização das membranas.

Para tentar colmatar este problema, no presente estudo utilizou-se como controlo

interno a hibridação da sonda do gene “*housekeeping*”  $\beta$ -actina com as amostras de RNA total dos animais em estudo. A proteína  $\beta$ -actina é essencial para a estrutura e para a cinética do citoesqueleto, de tal forma que o mRNA se expressa numa abundância moderada na maioria das células (Bustin, 2000).

Nas membranas em que se utilizou esta sonda aprecia-se uma maior intensidade de hibridação no controlo de fibroblastos fetais, seguido, por esta ordem, pelo grupo de animais secos, de baixa produção e de elevada produção de leite. Por outro lado, a observação das bandas de RNA 28S e 18S tingidas por brometo de etídeo nos géis de agarose-formaldeído indica a presença de uma ligeiramente maior quantidade de amostra nos poços correspondentes aos das ovelhas de elevada e de baixa produção, face aos animais secos e aos de fibroblastos fetais. Este contraste de resultados parece indicar que a utilização do gene “*housekeeping*”  $\beta$ -actina pode não ser um bom controlo.

Embora seja possível encontrar publicações de Northern blot em que este gene é utilizado como controlo interno na glândula mamária (Seol *et al.*, 2005), a maioria das investigações realizadas em mamíferos durante a fase de produção de leite, face a animais noutros estados, termina por obter resultados idênticos aos nossos.

Em 2007, Bionaz e Loor, recolheram biopsias da glândula mamária de vacas em diferentes estados de produção a fim de estudar a expressão de nove genes, para avaliar a capacidade desses genes como controlo interno neste tecido ao longo da lactação. Estes autores observaram que devido ao aumento gradual na concentração de RNA na glândula mamária durante a lactação, todos os genes estudados (incluindo o GAPD e o  $\beta$ -actina) sofrem um efeito de diluição e concluíram que a expressão dos genes UXT, RPS9 e RPS15 podem ser utilizados como controlos internos durante a lactação.

No estudo realizado por Gavin e McMahon (1992) em glândula mamária de ratas gestantes e lactentes, com o objectivo de controlar as variações na carga das amostras de RNA, as membranas de Northern blot foram hibridadas com o gene de  $\beta$ -actina. Muito embora esta sonda não tenha revelado os resultados esperados, constatou-se uma diminuição na intensidade e níveis muito baixos durante a lactação. Resultados idênticos foram obtidos com a sonda para o gene GAPDH, enzima fundamental na glicogénese, desempenhando um papel importante no metabolismo energético (Tatton *et al.*, 2000). Estes autores observaram igualmente que o RNA total tingido com brometo

de etídeo revela a presença de quantidades aproximadamente equivalentes de RNA presentes em todos os carris.

Também Reinhardt e Horst (1999), num estudo sobre a glândula mamária de ratas gestantes e lactentes, afirmam que todos os Northern blot foram normalizados para a expressão da  $\alpha$ -actina, observando-se que a intensidade das bandas resultantes da hibridação desta sonda parece mais intensa quando os animais se encontram gestantes. Os autores justificam que estes resultados se devem a um grande aumento da síntese de RNA pela glândula mamária em lactação, de tal forma que mRNA específicos, tais como as actinas, parecem declinar mas permanecem sem se alterar ou até podem aumentar ligeiramente.

O trabalho de Huang e Ip (2001) também permitiu observar que a expressão do gene GAPDH não é constante durante o desenvolvimento normal da glândula mamária, ocorrendo uma diminuição durante a gestação e a lactação, facto que, como antes fizeram referência outros autores (Marquis *et al.*, 1995), se atribui ao efeito de diluição dos genes de proteínas do leite. Este facto não impediu de quantificar os resultados da expressão dos genes em estudo, face à GAPDH que foi utilizada como controlo de carga e da integridade do RNA.

Os grupos de investigação de Yarus *et al.* (1997), de DeSantiago *et al.* (1998), de Lemkin *et al.* (2000), de Burke *et al.* (2003) e de Bong *et al.* (2004) estudaram a glândula mamária de ratas em distintas fases produtivas e utilizaram brometo de etídeo que permitiu a visualização das bandas de RNA 28S e 18S para normalizar os resultados obtidos pela técnica de Northern blot.

Assim, seguindo o exemplo dos trabalhos dos autores anteriormente mencionados, também nós decidimos utilizar como controlo de carga a banda de RNA ribossómica 28S visível nos géis de agarose-formaldeído. Posteriormente foram normalizados os resultados da intensidade de hibridação das sondas utilizadas para a banda RNA 28S.

Devemos referir que existem estudos realizados com o objectivo de quantificar a expressão de diferentes genes na glândula mamária de animais lactentes face a animais noutros estados, empregando a técnica de Northern blot. Naqueles estudos também foram utilizadas como controlo as bandas de RNA ribossómico (18S e 28S), mas visualizadas na membrana de nylon tingida com azul de metileno depois da

transferência do RNA total do gel de agarose-formaldeído (French *et al.* 1996; Broadhurst e Wheeler, 2001). Não obstante, estes autores utilizaram membranas de nylon não carregadas, o que torna possível a sua coloração; no entanto, as membranas por nós utilizadas (carregadas positivamente) não permitiram esta alternativa.

Outra opção descrita em estudos com objectivo idêntico ao anterior é a utilização na técnica de Northern blot de sondas específicas para hibridar com o RNA ribossómico (Cassy *et al.*, 2000). Embora esta parecesse ser a opção mais correcta para o nosso estudo, obrigaria à realização de mais hibridações nas membranas de nylon. Neste sentido, é conveniente assinalar que algumas membranas no processo de confirmação da expressão diferencial dos genes em estudo sofreram bastantes hibridações e lavagens (*stripping*), processos que deterioram a qualidade das membranas, o que não permitiu a realização de mais hibridações.

A pequena banda candidata de 133 bp é homóloga (94 / 103 bp) ao DNA do clone RP11-124M17 do cromossoma 9 humano (banda 19). Embora de forma pouca intensa, observa-se no gel de DD unicamente nos animais de elevada produção de leite. Uma vez que não sabemos o significado biológico deste clone, nem se observa uma intensidade forte da banda candidata nas ovelhas de elevada produção de leite e que a confirmação da expressão diferencial com bandas (sondas) pequenas (menores de 150 bp) muitas vezes falham o sinal de hibridação Northern blot, optámos por não confirmar a expressão diferencial desta banda candidata (Yoshikawa *et al.*, 1998; Lievens *et al.*, 2001).

A banda candidata 20 observa-se no gel DD mais nitidamente nos animais que produzem maior quantidade de leite, mas também se pode visualizar nas ovelhas de baixa produção e, embora de forma pouca intensa, nos animais não lactentes. Esta banda de 240 bp apresentou unicamente 24 bp de homologia com a sequência completa do clone RP11-467C18 no cromossoma 1 humano, sobre o qual não se conhece mais informação do que a fornecida pelo seu próprio nome. Uma vez que a diferença de intensidade entre os grupos de animais em estudo não é muito grande, não realizámos a confirmação por Northern blot.

A banda candidata 21 de 155 bp visualiza-se mais intensamente nas ovelhas lactentes, embora também se possa visualizar nos animais secos. Apresenta uma homologia de apenas 28 bp com a sequência completa da 3 BAC -543P4 do homem, da

qual não sabemos a sua função biológica. Por essa razão não realizámos a técnica de Northern blot, que nos iria permitir confirmar a expressão diferencial.

Uma banda de 203 bp (banda 22) com uma homologia de unicamente 23 bp com a sequência completa do clone RP23-462C14 do cromossoma 9 do rato (*Mus musculus*) observou-se no gel DD, e mais nitidamente nas ovelhas que não produzem leite, face a animais lactentes. Uma vez que não foi possível confirmar a expressão diferencial de todas as bandas candidatas obtidas por DD, optámos por não a utilizar como sonda em Northern blot, dado que também se pode visualizar com alguma intensidade nos outros grupos de animais em estudo e que os resultados do análise BLAST não são concludentes.

No gel de DD pode-se visualizar a banda candidata 23 nas ovelhas não lactentes e num animal de baixa produção de leite. Esta banda de 211 bp unicamente hibrida com 23 bp de sequência completa do clone: RP11-700F9 no cromossoma 11 do DNA genómico do homem (*Homo sapiens*). Não se optou por confirmar a expressão diferencial desta banda candidata, porque não parece exclusiva dos animais na fase não lactente, observando-se com a mesma intensidade numa das ovelhas lactentes.

Embora com pouca intensidade, unicamente é visível a banda 24 nas ovelhas de elevada produção. Esta banda com 142 bp apresenta uma homologia de 102 bp com a sequência completa da BAC CH240-268P24 de *Bos taurus*. Uma vez que não podíamos realizar a confirmação da expressão diferencial de todas as bandas candidatas, optámos por não realizar o Northern blot com esta sonda.

A banda candidata 25 observa-se no gel DD nos animais produtores de leite, embora com maior intensidade nas ovelhas de elevada produção. Esta banda é homóloga ao gene da caseína  $\alpha$ -S1, alelo F, exão 1-19, de *Capra hircus* (tabla 3 e 4). Não decidimos realizar a técnica de Northern blot para confirmar a expressão diferencial desta banda candidata, uma vez que já tínhamos confirmado que o mRNA da caseína- $\alpha$ -s1 da ovelha (*Ovis aries*) (banda candidata 13) se expressa em animais produtores de leite, mas que não se observa diferenças entre as ovelhas de baixa e de elevada produção.

O gel de DD parece indicar que a proteína ribossoma S25 (OVRPS25) de *Ovis aries* (banda 26) se expressa nos animais de alta produção de leite, um pouco menos nos animais de baixa produção e praticamente não se detecta no período em que as ovelhas

não produzem leite. Embora se saiba que os ribossomas são constituídos por quatro moléculas de RNA e 80 proteínas (entre as quais a S25) e que são responsáveis pela síntese de proteínas, não existiu, no entanto, a disponibilidade de confirmar a expressão diferencial de todas as bandas candidatas obtidas pela técnica de DD (Imai *et al.*, 1994; Karsi *et al.*, 2002). Optou-se por não realizar a técnica de Northern blot com esta banda, uma vez que a diferença de expressão entre os diversos grupos é menos intensa do que as outras bandas em que se decidiu confirmar a expressão.

No gel de DD a banda candidata 27 observa-se com maior intensidade em duas das três ovelhas na fase não produtiva de leite, mas pode-se observar, embora com menor intensidade, nos animais produtores de leite. Esta banda de 355 bp apresenta uma pequena homologia (51/57 bp) com o mRNA para lipofilina C do homem (*Homo sapiens*). Desconhece-se a função da lipofilina C, também conhecida por mamoglobina B, lacriglobina ou secretoglobina 2A1, que se expressa na glândula mamária entre outros tecidos. Por seu turno, há pouca diferença de intensidade desta banda entre os grupos de animais em estudo e, como já se referiu, a baixa homologia com a lipofilina C fez-nos optar por não realizar a comprovação da expressão diferencial (Xiao *et al.*, 2005; Stoeckelhuber *et al.*, 2006).

Embora seja visível em todos os animais de alta produção a banda candidata, também se pode visualizar a banda candidata 28 em dois animais de baixa produção. Esta banda de 190 bp apresenta uma homologia de unicamente 23 bp com a sequência completa da 12 BAC RP11-693J15 do homem. Desta sequência não se tem qualquer conhecimento da sua função biológica. Uma vez que a intensidade da banda 28 nos géis de DD não é muito forte não se realizou a técnica de Northern blot para confirmar a expressão diferencial.





## VII. CONCLUSÕES

1. Neste estudo não foi possível comprovar diferenças significativas na expressão de genes na glândula mamária de ovelhas de raça Churra de elevada e de baixa produção de leite.

2. Verificou-se uma maior proporção de genes que se expressam nas células mamárias de ovelhas quando estas produzem leite do que quando não estão no período de lactação.

3. Observou-se um aumento na expressão de genes que codificam proteínas do leite (caseínas) e dos genes relacionados com a actividade metabólica (glicerol-3-fosfato aciltransferase mitocondrial e mitocôndria) na glândula mamária, quando os animais produzem leite. Pareceu também existir um ligeiro aumento da expressão dos genes que codificam o canal de potássio da membrana celular das células da glândula mamária, quando produzem leite.

4. O mRNA expressado mais intensamente em animais não produtores de leite pode estar relacionado com a família de carreira de solutos.



**VIII. BIBLIOGRAFIA**

- Adjaye, J., Herwig, R., Herrmann, D., Wruck, W., Benkahla, A., Brink, T. C., Nowak, M., Carnwath, J. W., Hultschig, C., Niemann, H., & Lehrach, H. (2004). Cross-species hybridisation of human and bovine orthologous genes on high density cDNA microarrays. *BMC Genomics*, 5(1), 83.
- Ahmed, N., Siddiqui, A. A., & Ahmed, A. (2000). DDRT-PCR: use of agarose gels for detection of amplified products. *Mol Vis*, 6, 144-147.
- Akers, R. M. (2002). *Lactation and the mammary gland*: Iwo State Press.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Keith, R., & Watson, J. D. (1996). *Biología Molecular de la Célula*. (Tercera ed.).
- Ali, M., Markham, A. F., & Isaacs, J. D. (2001). Application of differential display to immunological research. *J Immunol Methods*, 250(1-2), 29-43.
- Alvarez, L., Gutierrez-Gil, B., San Primitivo, F., de la Fuente, L. F., & Arranz, J. J. (2006). Influence of prion protein genotypes on milk production traits in Spanish Churra sheep. *J Dairy Sci*, 89(5), 1784-1791.
- Alves, H. J., M., M. L., Jorge, E. C., Soares, A. S., Ledur, M. C., & Coutinho, L. L. (2006). Real-time quantitative RT-PCR analysis of myogenic factors expression (MyoD, myogenin and MRF-4) in two chicken lines (broiler and layer). Paper presented at the 30th International Conference on Animal Genetics., Porto Seguro, Brazil. Belo Horizonte, Brazil: CBRA, 2006. ISBN 85-85584-03-3 (CD); 85-85584-02-5.
- Amigo, L., Recio, I., & Ramos, M. (2000). Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk—a review. *Int. Dairy J.*, 10, 135–149.
- Anderic, I., Blum, R., Haase, W., Grinstein, S., & Thevenod, F. (1998). Expression of NHE1 and NHE4 in rat pancreatic zymogen granule membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 246(2), 330-336.
- Anderson, S. M., Rudolph, M. C., McManaman, J. L., & Neville, M. C. (2007). Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Res*, 9(1), 204.
- Armache, K. J., Kettenberger, H., & Cramer, P. (2005). The dynamic machinery of mRNA elongation. *Curr Opin Struct Biol*, 15(2), 197-203.
- Averboukh, L., Douglas, S. A., Zhao, S., Lowe, K., Maher, J., & Pardee, A. B. (1996). Better gel resolution and longer cDNAs increase the precision of differential display. *Biotechniques*, 20(5), 918-921.



- Balija, V. S., Chakraborty, T. R., Nikonov, A. V., Morimoto, T., & Haldar, D. (2000). Identification of two transmembrane regions and a cytosolic domain of rat mitochondrial glycerophosphate acyltransferase. *J Biol Chem*, 275(41), 31668-31673.
- Bammler, T., Beyer, R. P., Bhattacharya, S., Boorman, G. A., Boyles, A., Bradford, B. U., Bumgarner, R. E., Bushel, P. R., Chaturvedi, K., Choi, D., Cunningham, M. L., Deng, S., Dressman, H. K., Fannin, R. D., Farin, F. M., Freedman, J. H., Fry, R. C., Harper, A., Humble, M. C., Hurban, P., Kavanagh, T. J., Kaufmann, W. K., Kerr, K. F., Jing, L., Lapidus, J. A., Lasarev, M. R., Li, J., Li, Y. J., Lobenhofer, E. K., Lu, X., Malek, R. L., Milton, S., Nagalla, S. R., O'Malley J. P., Palmer, V. S., Pattee, P., Paules, R. S., Perou, C. M., Phillips, K., Qin, L. X., Qiu, Y., Quigley, S. D., Rodland, M., Rusyn, I., Samson, L. D., Schwartz, D. A., Shi, Y., Shin, J. L., Sieber, S. O., Slifer, S., Speer, M. C., Spencer, P. S., Sproles, D. I., Swenberg, J. A., Suk, W. A., Sullivan, R. C., Tian, R., Tennant, R. W., Todd, S. A., Tucker, C. J., Van Houten, B., Weis, B. K., Xuan, S., & Zarbl, H. (2005). Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nat Methods*, 2(5), 351-356.
- Barillet, F. (2007). Genetic improvement for dairy production in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 70, 60-75.
- Barillet, F., Arranz, J. J., & Carta, A. (2005). Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep. *Genet Sel Evol*, 37 Suppl 1, S109-123.
- Barr, K. J., Garrill, A., Jones, D. H., Orlowski, J., & Kidder, G. M. (1998). Contributions of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms to preimplantation development of the mouse. *Mol Reprod Dev*, 50(2), 146-153.
- Bas, A., Forsberg, G., Hammarstrom, S., & Hammarstrom, M. L. (2004). Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 59(6), 566-573.
- Bauman, D. E., & Griinari, J. M. (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu Rev Nutr*, 23, 203-227.
- Bauman, D. E., Mather, I. H., Wall, R. J., & Lock, A. L. (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J Dairy Sci*, 89(4), 1235-1243.
- Baumgard, L. H., Matitashvili, E., Corl, B. A., Dwyer, D. A., & Bauman, D. E. (2002). trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 85(9), 2155-2163.

- Bell, R. M., & Coleman, R. A. (1980). Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, 49, 459-487.
- Benne, R. (1996). RNA editing: how a message is changed. *Curr Opin Genet Dev*, 6(2), 221-231.
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2002). *Biochemistry, Fifth Edition*. W.H. Freeman, New York (USA), 1100 p.
- Berthelot, X., Lagriffoul, G., Concordet, D., Barillet, F., & Bergonier, D. (2006). Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. *Small Rumin. Res.*, 62., 27-31.
- Berthier, D., Quere, R., Thevenon, S., Belemsaga, D., Piquemal, D., Marti, J., & Maillard, J. C. (2003). Serial analysis of gene expression (SAGE) in bovine trypanotolerance: preliminary results. *Genet Sel Evol*, 35 Suppl 1, S35-47.
- Bertioli, D. J., Schlichter, U. H., Adams, M. J., Burrows, P. R., Steinbiss, H. H., & Antoniow, J. F. (1995). An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 23(21), 4520-4523.
- Bevilacqua, C., Helbling, J. C., Miranda, G., & Martin, P. (2006). Translational efficiency of casein transcripts in the mammary tissue of lactating ruminants. *Reprod Nutr Dev*, 46(5), 567-578.
- Bhatia, I. S., Saxena, A. K., & Ahuja, S. P. (1979). Effects of prolactin, insulin and corticosterone on the in vitro incorporation of 2-14C-acetate and U-14C-glucose into lipids by mammary gland slices, from a lactating buffalo. *Zentralbl Veterinarmed A*, 26(4), 309-317.
- Bionaz, M., & Loor, J. J. (2007). Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle. *Physiol Genomics*, 29(3), 312-319.
- Blanchard, R. K., & Cousins, R. J. (2000). Regulation of intestinal gene expression by dietary zinc: induction of uroguanylin mRNA by zinc deficiency. *J Nutr*, 130(5S Suppl), 1393S-1398S.
- Blum J.L., & Wicha, M. S. (1988). Role of the cytoskeleton in laminin induced mammary gene expression. *J Cell Physiol*, 135(1), 13-22.
- Bochu, W., Jin, Z., Biao, L., Daohong, W., & Chuanren, D. (2005). Study of mRNA expression of *Arabidopsis thaliana* under stimulation using modified differential display RT-PCR with silver staining. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 40(1), 31-34.
- Bockelmann, R., Bonnekoh, B., & Gollnick, H. (1999). Optimized visualization and PCR reamplification of differentially displayed cDNA bands detected by silver staining in

- polyacrylamide gels as established in the model of dithranol-treated keratinocytes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 12(1-2), 54-63.
- Boeger, H., Bushnell, D. A., Davis, R., Griesenbeck, J., Lorch, Y., Strattan, J. S., Westover, K. D., & Kornberg, R. D. (2005). Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Lett*, 579(4), 899-903.
- Bond, B. R., Ng, L. L., & Schulte, B. A. (1998). Identification of mRNA transcripts and immunohistochemical localization of Na/H exchanger isoforms in gerbil inner ear. *Hear Res*, 123(1-2), 1-9.
- Bong, J. J., Seol, M. B., Kim, H. H., Han, O., Back, K., & Baik, M. (2004). The 24p3 gene is induced during involution of the mammary gland and induces apoptosis of mammary epithelial cells. *Mol Cells*, 17(1), 29-34.
- Bonnet, M., Gourdou, I., Leroux, C., Chilliard, Y., & Djiane, J. (2002). Leptin expression in the ovine mammary gland: putative sequential involvement of adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. *J Anim Sci*, 80(3), 723-728.
- Bonsing, J., & Mackinlay, A. G. (1987). Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins. *J Dairy Res*, 54(3), 447-461.
- Bosch, I., Melichar, H., & Pardee, A. B. (2000). Identification of differentially expressed genes from limited amounts of RNA. *Nucleic Acids Res*, 28(7), E27.
- Bosch, T. C., & Lohmann, J. U. (1998). Identification of differentially expressed genes by nonradioactive differential display of messenger RNA. *Methods Mol Biol*, 86, 153-160.
- Boutinaud, M., & Jammes, H. (2004). Growth hormone increases Stat5 and Stat1 expression in lactating goat mammary gland: a specific effect compared to milking frequency. *Domest Anim Endocrinol*, 27(4), 363-378.
- Boutinaud, M., Rousseau, C., Keisler, D. H., & Jammes, H. (2003). Growth hormone and milking frequency act differently on goat mammary gland in late lactation. *J Dairy Sci*, 86(2), 509-520.
- Boyazoglu, J., & Morand-Fehr, P. (2001). Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality. A critical review. *Small Rumin Res*, 40(1), 1-11.
- Bragança, P., Arranz, J. J., & San Primitivo, F. (1999). Diseño de un sistema "MULTIPLEX" para el control de parentesco en ruminantes domésticos. Paper presented at the VIII Jornadas sobre producción animal. <http://www.dcam.upv.es/acteon/congresos/aida99/bragan.htm>.
- Bratanich, A., & Blanchetot, A. (2006). A gene similar to the human hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) gene is upregulated during Porcine Circovirus type 2 infection. *Virus Genes*, 32(2), 145-152.



- Braunschweig, M., Hagger, C., Stranzinger, G., & Puhan, Z. (2000). Associations between casein haplotypes and milk production traits of Swiss Brown cattle. *J Dairy Sci*, 83(6), 1387-1395.
- Brenner, S. (1999). Sillycon valley fever. *Curr Biol*, 9(18), R671.
- Britten, R. J., & Kohne, D. E. (1968). Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science*, 161(841), 529-540.
- Brivanlou, A. H., & Darnell, J. E., Jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, 295(5556), 813-818.
- Broadhurst, M. K., & Wheeler, T. T. (2001). The p100 coactivator is present in the nuclei of mammary epithelial cells and its abundance is increased in response to prolactin in culture and in mammary tissue during lactation. *J Endocrinol*, 171(2), 329-337.
- Brown A., Hillarby C., & Brandwood, C. (1997). Use of poly A RT-PCR coupled with substrative hybridization to isolate novel genes involved in osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(Supplement 1), S281.
- Brown A.J., Hutchings C., Burke J.F., & Mayne, L. V. (1999). Targeted display: a new technique for the analysis of differential gene expression. *Methods Enzymol.* , 30(3), 392-408.
- Burke, M. A., Hutter, D., Reshamwala, R. P., & Knepper, J. E. (2003). Cathepsin L plays an active role in involution of the mouse mammary gland. *Dev Dyn*, 227(3), 315-322.
- Buser, A. C., Gass-Handel, E. K., Wyszomierski, S. L., Doppler, W., Leonhardt, S. A., Schaack, J., Rosen, J. M., Watkin, H., Anderson, S. M., & Edwards, D. P. (2007). Progesterone receptor repression of prolactin/signal transducer and activator of transcription 5-mediated transcription of the beta-casein gene in mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol*, 21(1), 106-125.
- Bushnell, D. A., Westover, K. D., Davis, R. E., & Kornberg, R. D. (2004). Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocystal at 4.5 Angstroms. *Science*, 303(5660), 983-988.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2), 169-193.
- Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29(1), 23-39.
- Byers, R. J., Hoyland, J. A., Dixon, J., & Freemont, A. J. (2000). Subtractive hybridization--genetic takeaways and the search for meaning. *Int J Exp Pathol*, 81(6), 391-404.

- Caja, G., Torres, A., Fernández, N., Molina, M., & Gallego, L. (1986). Conclusiones actuales sobre aptitud al ordeño mecánico, relaciones entre fracciones de ordeño y entre componentes lácteos y su aplicación a la mejora de la raza ovina Manchega. Paper presented at the Jornadas sobre mejora genética del ganado ovino de leche, INIA.Madrid. 33-501.
- Calin, G. A., Liu, C. G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., Dell'Aquila, M. L., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T. J., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C. M. (2004). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(32), 11755-11760.
- Cao, J., Li, J. L., Li, D., Tobin, J. F., & Gimeno, R. E. (2006). Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(52), 19695-19700.
- Capuco, A. V., & Ellis, S. (2005). Bovine mammary progenitor cells: current concepts and future directions. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10(1), 5-15.
- Carriedo, J. A., Diez, R., & San Primitivo, F. (1982). Genetic Study of Some Factors Influencing the Milk Production of Dairy Ewes II. Environmental Factors. Paper presented at the 2nd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Madrid.
- Casanova, A. M., López-Brea, J. J. G., & Martínez, L. G. (1996). Producción de Leche en la Oveja: Carbó, B.C.
- Cassy, S., Charlier, M., Belair, L., Guillomot, M., Laud, K., & Djiane, J. (2000). Increase in prolactin receptor (PRL-R) mRNA level in the mammary gland after hormonal induction of lactation in virgin ewes. *Domest Anim Endocrinol*, 18(1), 41-55.
- Casu, S., Pernazza, I., & Carta, A. (2006). Feasibility of a linear scoring method of udder morphology for the selection scheme of Sardinian sheep. *J Dairy Sci*, 89(6), 2200-2209.
- Cella N., Groner B., & Hynes, N. E. (1998). Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Mol Cell Biol.*, 18(4), 1783-1792.
- Ceriotti, G., Chessa, S., Bolla, P., Budelli, E., Bianchi, L., Duranti, E., & Caroli, A. (2004). Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *J Dairy Sci*, 87(8), 2606-2613.
- Chabanon, H., Mickleburgh, I., & Hesketh, J. (2004). Zipcodes and postage stamps: mRNA localisation signals and their trans-acting binding proteins. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 3(3), 240-256.
- Chambrey, R., St John, P. L., Eladari, D., Quentin, F., Warnock, D. G., Abrahamson, D. R., Podevin, R. A., & Paillard, M. (2001). Localization and functional characterization of

- Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE4 in rat thick ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281(4), F707-717.
- Chen, J. J., Rowley, J. D., & Wang, S. M. (2000). Generation of longer cDNA fragments from serial analysis of gene expression tags for gene identification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(1), 349-353.
- Chen, S. H., Habib, G., Yang, C. Y., Gu, Z. W., Lee, B. R., Weng, S. A., Silberman, S. R., Cai, S. J., Deslypere, J. P., Rosseneu, M., & et al. (1987). Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science*, 238(4825), 363-366.
- Chen, Y., Zhang, Y. Z., Zhou, Z. G., Wang, G., & Yi, Z. N. (2006). Identification of differently expressed genes in human colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 12(7), 1025-1032.
- Cheng, J. C., Moore, T. B., & Sakamoto, K. M. (2003). RNA interference and human disease. *Mol Genet Metab*, 80(1-2), 121-128.
- Chessa, S., Budelli, E., Gutscher, K., Caroli, A., & Erhardt, G. (2003). Short communication: Simultaneous identification of five kappa-casein (CSN3) alleles in domestic goat by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *J Dairy Sci*, 86(11), 3726-3729.
- Cheung, P., & Lau, P. (2005). Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol*, 19(3), 563-573.
- Cho, Y. J., Meade, J. D., Walden, J. C., Chen, X., Guo, Z., & Liang, P. (2001). Multicolor fluorescent differential display. *Biotechniques*, 30(3), 562-568, 570, 572.
- Cho, Y. J., Prezioso, V. R., & Liang, P. (2002). Systematic analysis of intrinsic factors affecting differential display. *Biotechniques*, 32(4), 762-764, 766.
- Cho, Y. J., Stein, S., Jackson, R. S., Jr., & Liang, P. (2006). Saturation screening for p53 target genes by digital fluorescent differential display. *Methods Mol Biol*, 317, 179-192.
- Choi, K. M., Barash, I., & Rhoads, R. E. (2004). Insulin and prolactin synergistically stimulate beta-casein messenger ribonucleic acid translation by cytoplasmic polyadenylation. *Mol Endocrinol*, 18(7), 1670-1686.
- Chomczynski, P., Qasba, P., & Topper, Y. J. (1984). Essential role of insulin in transcription of the rat 25,000 molecular weight casein gene. *Science*, 226(4680), 1326-1328.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159.

- Christoffels, V. M., Keijser, A. G., Houweling, A. C., Clout, D. E., & Moorman, A. F. (2000). Patterning the embryonic heart: identification of five mouse Iroquois homeobox genes in the developing heart. *Dev Biol*, 224(2), 263-274.
- Clarkson, R. W., Boland, M. P., Kritikou, E. A., Lee, J. M., Freeman, T. C., Tiffen, P. G., & Watson, C. J. (2006). The genes induced by signal transducer and activators of transcription (STAT)3 and STAT5 in mammary epithelial cells define the roles of these STATs in mammary development. *Mol Endocrinol*, 20(3), 675-685.
- Clarkson, R. W., & Watson, C. J. (2004). Microarray analysis of the involution switch. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 8(3), 309-319.
- Clinton, M., Miele, G., Nandi, S., & McBride, D. (2006). Identification of disease markers by differential display: prion disease. *Methods Mol Biol*, 317, 157-178.
- Coleman, R. A., & Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*, 43(2), 134-176.
- Coleman, R. A., Lewin, T. M., & Muoio, D. M. (2000). Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu Rev Nutr*, 20, 77-103.
- Collett, J. R., Cho, E. J., & Ellington, A. D. (2005). Production and processing of aptamer microarrays. *Methods*, 37(1), 4-15.
- Collier, R. J., Bauman, D. E., & Hays, R. L. (1977). Lactogenesis in explant cultures of mammary tissue from pregnant cows. *Endocrinology*, 100(4), 1192-1200.
- Collins, J. F., Xu, H., Kiela, P. R., Zeng, J., & Ghishan, F. K. (1998). Ontogeny of basolateral membrane sodium-hydrogen exchange (NHE) activity and mRNA expression of NHE-1 and NHE-4 in rat kidney and jejunum. *Biochim Biophys Acta*, 1369(2), 247-258.
- Colonna-Romano, S., Leone, A., & Maresca, B. (1998). *Differential-Display Reverse Transcription-PCR (DDRT-PCR)*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Conaway, R. C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., & Conaway, J. W. (2005). The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, 30(5), 250-255.
- Connor, E. E., Meyer, M. J., Li, R. W., Van Amburgh, M. E., Boisclair, Y. R., & Capuco, A. V. (2007). Regulation of gene expression in the bovine mammary gland by ovarian steroids. *J Dairy Sci*, 90 Suppl 1, E55-65.
- Costessi, L., Devescovi, G., Baralle, F. E., & Muro, A. F. (2006). Brain-specific promoter and polyadenylation sites of the beta-adducin pre-mRNA generate an unusually long 3'-UTR. *Nucleic Acids Res*, 34(1), 243-253.
- Cottrell, T. R., & Doering, T. L. (2003). Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. *Trends Microbiol*, 11(1), 37-43.

- Dakis, D., & Kouretas, D. (2002). Differential display of m-RNAs in fish gonads by modified DD-PCR. *In Vivo*, 16(2), 103-105.
- Darden, D. L., Hu, F. Z., Ehrlich, M. D., Gorry, M. C., Dressman, D., Li, H. S., Whitcomb, D. C., Hebda, P. A., Dohar, J. E., & Ehrlich, G. D. (2000). RNA differential display of scarless wound healing in fetal rabbit indicates downregulation of a CCT chaperonin subunit and upregulation of a glycophorin-like gene transcript. *J Pediatr Surg*, 35(3), 406-419.
- Davies, C. R., Morris, J. S., Griffiths, M. R., Page, M. J., Pitt, A., Stein, T., & Gusterson, B. A. (2006). Proteomic analysis of the mouse mammary gland is a powerful tool to identify novel proteins that are differentially expressed during mammary development. *Proteomics*, 6(21), 5694-5704.
- de la Cruz, X., Lois, S., Sanchez-Molina, S., & Martinez-Balbas, M. A. (2005). Do protein motifs read the histone code? *Bioessays*, 27(2), 164-175.
- De la Fuente, L. F. (1996). Problemática del programa de selección de la raza Churra. Paper presented at the ITEA, 92A:31-43.
- De La Fuente, L. F. (2000). Memoria del proyecto docente. Universidad de León.
- de Leeuw, W. J., Slagboom, P. E., & Vijg, J. (1989). Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control. *Nucleic Acids Res*, 17(23), 10137-10138.
- de Silva, M. G., Elliott, K., Dahl, H. H., Fitzpatrick, E., Wilcox, S., Delatycki, M., Williamson, R., Efron, D., Lynch, M., & Forrest, S. (2003). Disruption of a novel member of a sodium/hydrogen exchanger family and DOCK3 is associated with an attention deficit hyperactivity disorder-like phenotype. *J Med Genet*, 40(10), 733-740.
- De Vries, F., Hamann, H., Drogemuller, C., Ganter, M., & Distl, O. (2005). Analysis of associations between the prion protein genotypes and production traits in East Friesian milk sheep. *J Dairy Sci*, 88(1), 392-398.
- Dean, A. (2006). On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet*, 22(1), 38-45.
- DeJong, J. (2006). Basic mechanisms for the control of germ cell gene expression. *Gene*, 366(1), 39-50.
- Dekkers, J. C. (2004). Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J Anim Sci*, 82 E-Suppl, E313-328.
- DeSantiago, S., Torres, N., Suryawan, A., Tovar, A. R., & Hutson, S. M. (1998). Regulation of branched-chain amino acid metabolism in the lactating rat. *J Nutr*, 128(7), 1165-1171.

- Devinoy, E., Houdebine, L. M., & Delouis, C. (1978). Role of prolactin and glucocorticoids in the expression of casein genes in rabbit mammary gland organ culture. Quantification of casein mRNA. *Biochim Biophys Acta*, 517(2), 360-366.
- Diachenko, L. B., Ledesma, J., Chenchik, A. A., & Siebert, P. D. (1996). Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 219(3), 824-828.
- Dietel, M., & Sers, C. (2006). Personalized medicine and development of targeted therapies: the upcoming challenge for diagnostic molecular pathology. A review. *Virchows Arch*, 448(6), 744-755.
- Dilks, D. W., Ring, R. H., Khawaja, X. Z., Novak, T. J., & Aston, C. (2003). High-throughput confirmation of differential display PCR results using reverse Northern blotting. *J Neurosci Methods*, 123(1), 47-54.
- Dircks, L. K., Ke, J., & Sul, H. S. (1999). A conserved seven amino acid stretch important for murine mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. Significance of arginine 318 in catalysis. *J Biol Chem*, 274(49), 34728-34734.
- Disenhaus, C., Jammes, H., Hervieu, J., Ternois, F., & Sauvart, D. (1995). Effects of recombinant bovine somatotropin on goat milk yield, composition and plasma metabolites. *Small Ruminant Research*, 15, 139-148.
- Dontu, G., & Wicha, M. S. (2005). Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10(1), 75-86.
- Dorroch, U., Goldammer, T., Brunner, R. M., Kata, S. R., Kuhn, C., Womack, J. E., & Schwerin, M. (2001). Isolation and characterization of hepatic and intestinal expressed sequence tags potentially involved in trait differentiation between cows of different metabolic type. *Mamm Genome*, 12(7), 528-537.
- Doss, R. P. (1996). Differential display without radioactivity--a modified procedure. *Biotechniques*, 21(3), 408-410, 412.
- Draghici, S., Khatri, P., Eklund, A. C., & Szallasi, Z. (2006). Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet*, 22(2), 101-109.
- Draghici, S., Chatterjee M., & A., T. M. (2005). Epitomics: serum screening for the early detection of cancer on microarrays using complex panels of tumor antigens. *Expert Rev Mol Diagn.*, 5 (5), 735-743.
- Dralyuk, I., Brudno, M., Gelfand, M. S., Zorn, M., & Dubchak, I. (2000). ASDB: database of alternatively spliced genes. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 296-297.

- Dreels, J. M., & Baumrucker, C. R. (1982). Bovine milk-associated calcium as an uncoupling factor of mitochondrial respiration. *J Dairy Sci*, 65(7), 1141-1147.
- Drozd, M., Quijada, L., & Clayton, C. E. (2002). RNA interference in trypanosomes transfected with sense and antisense plasmids. *Mol Biochem Parasitol*, 121(1), 149-152.
- Dudley, N. R., Labbe, J. C., & Goldstein, B. (2002). Using RNA interference to identify genes required for RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(7), 4191-4196.
- Dynlacht B.D., Hoey T., & Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, 66(3), 563-576.
- El-Saied U.M., De La Fuente L.F., Carriedo J.A., & Primitivo, F. S. (2005). Genetic and phenotypic parameter estimates of total and partial lifetime traits for dairy ewes. *J Dairy Sci*, 88(9), 3265-3272.
- El-Saied, U. M., Carriedo, J. A., de la Fuente, L. F., & San Primitivo, F. (1999). Genetic parameters of lactation cell counts and milk and protein yields in dairy ewes. *J Dairy Sci*, 82(3), 639-644.
- El-Saied, U. M., Carriedo, J. A., & San Primitivo, F. (1998). Heritability of test day somatic cell counts and its relationship with milk yield and protein percentage in dairy ewes. *J Dairy Sci*, 81(11), 2956-2961.
- El-Zarei, M. F. (2005). Detección de QTLs implicados en la producción láctea y en la morfología mamaria mediante secuencias microsatélites en el ganado ovino. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Ericsson, J., Jackson, S. M., Kim, J. B., Spiegelman, B. M., & Edwards, P. A. (1997). Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem*, 272(11), 7298-7305.
- Eul, J., Graessmann, M., & Graessmann, A. (1996). Trans-splicing and alternative-tandem-cis-splicing: two ways by which mammalian cells generate a truncated SV40 T-antigen. *Nucleic Acids Res*, 24(9), 1653-1661.
- Fan, X., Shi, H., & Lis, J. T. (2005). Distinct transcriptional responses of RNA polymerases I, II and III to aptamers that bind TBP. *Nucleic Acids Res*, 33(3), 838-845.
- Farrell, H. M., Jr., Cooke, P. H., Wickham, E. D., Piotrowski, E. G., & Hoagland, P. D. (2003). Environmental influences on bovine kappa-casein: reduction and conversion to fibrillar (amyloid) structures. *J Protein Chem*, 22(3), 259-273.
- Faulds, M. H., Olsen, H., Helguero, L. A., Gustafsson, J. A., & Haldosen, L. A. (2004). Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol*, 18(2), 412-421.



- FEAGAS (2004). Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto. <http://www.feagas.es>.
- Fernandez, G., Baro, J. A., de la Fuente, L. F., & San Primitivo, F. (1997). Genetic parameters for linear udder traits of dairy ewes. *J Dairy Sci*, 80(3), 601-605.
- Ferranti, P., Addeo, F., Malorni, A., Chianese, L., Leroux, C., & Martin, P. (1997). Differential splicing of pre-messenger RNA produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein. *Eur J Biochem*, 249(1), 1-7.
- Ferranti, P., Malorni, A., Nitti, G., Laezza, P., Pizzano, R., Chianese, L., & Addeo, F. (1995). Primary structure of ovine alpha s1-caseins: localization of phosphorylation sites and characterization of genetic variants A, C and D. *J Dairy Res*, 62(2), 281-296.
- Feuermann, Y., Mabweesh, S. J., & Shamay, A. (2004). Leptin affects prolactin action on milk protein and fat synthesis in the bovine mammary gland. *J Dairy Sci*, 87(9), 2941-2946.
- Finta, C., & Zaphiropoulos, P. G. (2002). Intergenic mRNA molecules resulting from trans-splicing. *J Biol Chem*, 277(8), 5882-5890.
- Fisher, L., & Ransom, D. C. (1995). An empirically derived typology of families: I. Relationships with adult health. *Fam Process*, 34(2), 161-182.
- Fislage, R., Berceanu, M., Humboldt, Y., Wendt, M., & Oberender, H. (1997). Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 25(9), 1830-1835.
- Foley, J., Dann, P., Hong, J., Cosgrove, J., Dreyer, B., Rimm, D., Dunbar, M., Philbrick, W., & Wysolmerski, J. (2001). Parathyroid hormone-related protein maintains mammary epithelial fate and triggers nipple skin differentiation during embryonic breast development. *Development*, 128(4), 513-525.
- Foss, R. D., Guha-Thakurta, N., Conran, R. M., & Gutman, P. (1994). Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Comparison of two housekeeping gene mRNA controls. *Diagn Mol Pathol*, 3(3), 148-155.
- French, L. E., Soriano, J. V., Montesano, R., & Pepper, M. S. (1996). Modulation of clusterin gene expression in the rat mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *Biol Reprod*, 55(6), 1213-1220.
- Fries, R., & Thaller, G. (2003). Present status and perspectives of molecular animal breeding. *Zuchtungskunde* 75(5), 324-335.
- Fuchs, M., Maier, R. M., & Zeltz, P. (2001). RNA editing in higher plant plastids: oligoribonucleotide SSCP analysis allows the proof of base conversion directly at the RNA level. *Curr Genet*, 39(5-6), 384-387.

- Fuentes, G. F. C., Sánchez, J. M., & Abascal, G. C. (2000). *Manual de etnología animal: razas de ruminantes*: DM, Librero Editor, Murcia.
- Fuertes, J. A. (1998). Estudio de la producción, composición, recuento celular de la leche y de la morfología mamaria en el ganado ovino de la raza Churra: aplicación al control lechero oficial. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Fujino, M., Kawasaki, M., Adachi, K., & Li, X. K. (2006). Differential-display analysis of gene expression in livers from normal and partially hepatectomized mice. *Transplant Proc*, 38(8), 2701-2704.
- Gallego, M. I., Binart, N., Robinson, G. W., Okagaki, R., Coschigano, K. T., Perry, J., Kopchick, J. J., Oka, T., Kelly, P. A., & Hennighausen, L. (2001). Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Dev Biol*, 229(1), 163-175.
- Gavin, B. J., & McMahon, A. P. (1992). Differential regulation of the Wnt gene family during pregnancy and lactation suggests a role in postnatal development of the mammary gland. *Mol Cell Biol*, 12(5), 2418-2423.
- Gawenis, L. R., Greeb, J. M., Prasad, V., Grisham, C., Sanford, L. P., Doetschman, T., Andringa, A., Miller, M. L., & Shull, G. E. (2005). Impaired gastric acid secretion in mice with a targeted disruption of the NHE4 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Biol Chem*, 280(13), 12781-12789.
- Geiduschek, E. P., & Kassavetis, G. A. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol*, 310(1), 1-26.
- George, K. S., Zhao, X., Gallahan, D., Shirkey, A., Zareh, A., & Esmaeli-Azad, B. (1997). Capillary electrophoresis methodology for identification of cancer related gene expression patterns of fluorescent differential display polymerase chain reaction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 695(1), 93-102.
- Georges M., Nielsen D., Mackinnon M., Mishra A., Okimoto R., Pasquino A.T., Sargeant L.S., Sorensen A., Steele M.R., Zhao X., Womack J.E., & Hoeschele, I. (1995). Mapping quantitative trait loci controlling milk production by exploiting progeny testing. *Genetics*, 139, 907-920.
- Gerber, M., Eissenberg, J. C., Kong, S., Tenney, K., Conaway, J. W., Conaway, R. C., & Shilatifard, A. (2004). In vivo requirement of the RNA polymerase II elongation factor elongin A for proper gene expression and development. *Mol Cell Biol*, 24(22), 9911-9919.
- Gingerich, T. J., Feige, J. J., & LaMarre, J. (2004). AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. *Anim Health Res Rev*, 5(1), 49-63.

- Glare, E. M., Divjak, M., Bailey, M. J., & Walters, E. H. (2002). beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*, 57(9), 765-770.
- Godmann, M., Kromberg, I., Mayer, J., & Behr, R. (2005). The mouse Kruppel-like Factor 4 (Klf4) gene: four functional polyadenylation sites which are used in a cell-specific manner as revealed by testicular transcript analysis and multiple processed pseudogenes. *Gene*, 361, 149-156.
- Golden, T., Dean, N. M., & Honkanen, R. E. (2002). Use of antisense oligonucleotides: advantages, controls, and cardiovascular tissue. *Microcirculation*, 9(1), 51-64.
- Gonzalo, C., Carriedo, J. A., Baro, J. A., & san Primitivo, F. (1994). Factors influencing variation of test day milk yield, somatic cell count, fat, and protein in dairy sheep. *J Dairy Sci*, 77(6), 1537-1542.
- Gootwine, E., Zenu, A., Bor, A., Yossafi, S., Rosov, A., & Pollot, G. E. (2001). Genetic and economic analysis of introgression the B allele of the FecB (Booroola) gene into the Awassi and Assaf dairy breeds. *Livest Prod Sci*, 71, 49-58.
- Grasser, K. D. (2005). Emerging role for transcript elongation in plant development. *Trends Plant Sci*, 10(10), 484-490.
- Gray, C. A., Abbey, C. A., Beremand, P. D., Choi, Y., Farmer, J. L., Adelson, D. L., Thomas, T. L., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. (2006). Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon tau in the ovine uterus. *Biol Reprod*, 74(2), 383-394.
- Gray, J. W., & Collins, C. (2000). Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis*, 21(3), 443-452.
- Graziano, M., D'Andrea, M., Reale, S., & Pilla, F. (2005). Study of the Structure and Expression of the Genes Involved in Lipid Metabolism in Small Ruminants. Final Report Project PRIN 2006. Italian Ministry of Research and Education.
- Greenland, K. J., Rekaris, G., MacLean, H. E., Warne, G. L., & Zajac, J. D. (2004). Application of differential display in the identification of androgen-regulated genes. *Endocr Res*, 30(1), 69-82.
- Griffiths, A.J.F, Miller J.H., Suzuki D., Lewontin R.C., & Gelbart, W. M. (2002). *Genética*. (7ª ed.). España.
- Grimm, S. L., & Rosen, J. M. (2003). The role of C/EBPbeta in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 8(2), 191-204.
- Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Cambisano, N., Kim, J. J., Kvasz, A., Mni, M., Simon, P., Frere, J. M., Coppieters, W., & Georges, M. (2004). Genetic and functional confirmation of

- the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8), 2398-2403.
- Groenen, M. A., Dijkhof, R. J., Verstege, A. J., & van der Poel, J. J. (1993). The complete sequence of the gene encoding bovine alpha s2-casein. *Gene*, 123(2), 187-193.
- Groenen, P. J., & van den Heuvel, L. P. (2006). Teaching molecular genetics: Chapter 3- Proteomics in nephrology. *Pediatr Nephrol*, 21(5), 611-618.
- Groner, B. (2002). Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. *Domest Anim Endocrinol*, 23(1-2), 25-32.
- Guhaniyogi, J., & Brewer, G. (2001). Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*, 265(1-2), 11-23.
- Gupta, N., Martin, P. M., Miyauchi, S., Ananth, S., Herdman, A. V., Martindale, R. G., Podolsky, R., & Ganapathy, V. (2006). Down-regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 343(2), 571-577.
- Gustafsson, C. M., & Samuelsson, T. (2001). Mediator--a universal complex in transcriptional regulation. *Mol Microbiol*, 41(1), 1-8.
- Gutiérrez-Gil, B. (2005). Detección de regiones genómicas con influencia sobre caracteres de producción láctea y morfología mamaria en el ganado ovino Churra. Tesis Doctoral, Universidad de León.
- Haenlein, G. F. W. (2007). About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Ruminant Research*, 68(3-6).
- Hagen, I. J., Zadissa, A., McEwan, J. C., Veenliet, B. A., Hickey, S. M., Cullen, N. G., Morris, C. A., & Wilson, T. (2005). Molecular and bioinformatic strategies for gene discovery for meat traits: a reverse genetics approach *Australian journal of experimental agriculture*, 45 (7-8), 801-807.
- Hall, A. J., Masel, A., Bell, K., Halliday, J. A., Shaw, D. C., & VandeBerg, J. L. (2001). Characterization of baboon (*Papio hamadryas*) milk proteins. *Biochem Genet*, 39(1-2), 59-71.
- Hammond, L. E., Gallagher, P. A., Wang, S., Hiller, S., Kluckman, K. D., Posey-Marcos, E. L., Maeda, N., & Coleman, R. A. (2002). Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-deficient mice have reduced weight and liver triacylglycerol content and altered glycerolipid fatty acid composition. *Mol Cell Biol*, 22(23), 8204-8214.
- Harvatine, K. J., & Bauman, D. E. (2006). SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *J Nutr*, 136(10), 2468-2474.

- Hausmann, S., Koiwa, H., Krishnamurthy, S., Hampsey, M., & Shuman, S. (2005). Different strategies for carboxyl-terminal domain (CTD) recognition by serine 5-specific CTD phosphatases. *J Biol Chem*, 280(45), 37681-37688.
- Hennighausen, L., & Robinson, G. W. (2001). Signaling pathways in mammary gland development. *Dev Cell*, 1(4), 467-475.
- Hepperle, C., & Hartfelder, K. (2001). Differentially expressed regulatory genes in honey bee caste development. *Naturwissenschaften*, 88(3), 113-116.
- Hervas, G., Ramella, J. L., Lopez, S., Gonzalez, J. S., & Mantecon, A. R. (2006). Effect of omitting one or two milkings weekly on lactational performance in dairy ewes. *J Dairy Res*, 73(2), 207-215.
- Hill, C., Giesberts, A. N., & White, S. J. (2002). Expression of isoforms of the Na(+)/H(+) exchanger in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282(4), F649-654.
- Hinrichs, J. (2004). Mediterranean milk and milk products. *Eur J Nutr*, 43 Suppl 1, I/12-17.
- Hoheisel, J. D. (2006). Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet*, 7(3), 200-210.
- Holland, J. W., Deeth, H. C., & Alewood, P. F. (2004). Proteomic analysis of kappa-casein micro-heterogeneity. *Proteomics*, 4(3), 743-752.
- Holland, M. S., & Holland, R. E. (2005). The cellular perspective on mammary gland development: stem/progenitor cells and beyond. *J Dairy Sci*, 88 Suppl 1, E1-8.
- Horiuchi, T., & Aigaki, T. (2006). Alternative trans-splicing: a novel mode of pre-mRNA processing. *Biol Cell*, 98(2), 135-140.
- Huang, R. Y., & Ip, M. M. (2001). Differential expression of integrin mRNAs and proteins during normal rat mammary gland development and in carcinogenesis. *Cell Tissue Res*, 303(1), 69-80.
- Huang, Y., & Maraia, R. J. (2001). Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Res*, 29(13), 2675-2690.
- Huq, N. L., Cross, K. J., Ung, M., & Reynolds, E. C. (2005). A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4. *Arch Oral Biol*, 50(7), 599-609.
- Huynh, H., Ng, C. Y., Ong, C. K., Lim, K. B., & Chan, T. W. (2001). Cloning and characterization of a novel pregnancy-induced growth inhibitor in mammary gland. *Endocrinology*, 142(8), 3607-3615.

- Ikonomov, O. C., & Jacob, M. H. (1996). Differential display protocol with selected primers that preferentially isolates mRNAs of moderate- to low-abundance in a microscopic system. *Biotechniques*, 20(6), 1030-1034, 1036-1038, 1040-1032.
- Imai T., Sudo K., & Miwa, T. (1994). Assignment of the human ribosomal protein S25 gene (RPS25) to chromosome 11q23.3 by sequence analysis of the marker D11S456. *Genomics*, 20(1), 142-143.
- Ing, N. H., Wolfskill, R. L., Clark, S., Degraauw, J. A., & Gill, C. A. (2006). Steroid hormones acutely regulate expression of a nudix protein-encoding gene in the endometrial epithelium of sheep. *Mol Reprod Dev*, 73(8), 967-976.
- Ito, T., Kito, K., Adati, N., Mitsui, Y., Hagiwara, H., & Sakaki, Y. (1994). Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Lett*, 351(2), 231-236.
- Ito, T., & Sakaki, Y. (1997). Fluorescent differential display. *Methods Mol Biol*, 85, 37-44.
- Ivashuta, S., Uchiyama, K., Gau, M., & Shimamoto, Y. (2002). Linear amplification coupled with controlled extension as a means of probe amplification in a cDNA array and gene expression analysis during cold acclimation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J Exp Bot*, 53(367), 351-359.
- Janzen, M. A., Kuhlers, D. L., Jungst, S. B., & Louis, C. F. (2000). ARPP-16 mRNA is up-regulated in the longissimus muscle of pigs possessing an elevated growth rate. *J Anim Sci*, 78(6), 1475-1484.
- Jeanteur, P., & Tazi, J. (2005). [Alternative splicing: a novel pharmacological target with wide therapeutic potential]. *Bull Acad Natl Med*, 189(5), 949-959; discussion 959-961.
- Jenkins, T. C., & McGuire, M. A. (2006). Major advances in nutrition: impact on milk composition. *J Dairy Sci*, 89(4), 1302-1310.
- Jo, H., Cho, Y. J., Zhang, H., & Liang, P. (2001). Differential display analysis of gene expression altered by ras oncogene. *Methods Enzymol*, 332, 233-244.
- Jolivet, G., Pantano, T., & Houdebine, L. M. (2005). Regulation by the extracellular matrix (ECM) of prolactin-induced alpha s1-casein gene expression in rabbit primary mammary cells: role of STAT5, C/EBP, and chromatin structure. *J Cell Biochem*, 95(2), 313-327.
- Jones, K. A., & Kadonaga, J. T. (2000). Exploring the transcription-chromatin interface. *Genes Dev*, 14(16), 1992-1996.
- Jones, S. W., Cai, D., Weislow, O. S., & Esmali-Azad, B. (1997). Generation of multiple mRNA fingerprints using fluorescence-based differential display and an automated DNA sequencer. *Biotechniques*, 22(3), 536-540, 542-533.

- Jones, W. K., Yu-Lee, L. Y., Clift, S. M., Brown, T. L., & Rosen, J. M. (1985). The rat casein multigene family. Fine structure and evolution of the beta-casein gene. *J Biol Chem*, 260(11), 7042-7050.
- Juergens, W. G., Stockdale, F. E., Topper, Y. J., & Elias, J. J. (1965). Hormone-dependent differentiation of mammary gland in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 54(2), 629-634.
- Kalirai, H., & Clarke, R. B. (2006). Human breast epithelial stem cells and their regulation. *J Pathol*, 208(1), 7-16.
- Kappel, S., Matthes, Y., Zimmer, B., Kaufmann, M., & Strebhardt, K. (2006). Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi-cassettes. *Nucleic Acids Res*, 34(16), 4527-4536.
- Kappeler, S. R., Farah, Z., & Puhan, Z. (2003). 5'-flanking regions of camel milk genes are highly similar to homologue regions of other species and can be divided into two distinct groups. *J Dairy Sci*, 86(2), 498-508.
- Karin, M., & Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol*, 5(7), 747-757.
- Karsi A., Patterson A., Feng J., & Liu, Z. (2002). Translational machinery of channel catfish: I. A transcriptomic approach to the analysis of 32 40S ribosomal protein genes and their expression. *Gene*, 291(1-2), 177-186.
- Kaskous, S., Gottschalk, J., Hippel, T., & Grun, E. (2003)a. The behavior of growth-influencing and steroid hormones in the blood plasma during pregnancy of Awassi sheep in Syria. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 116(3-4), 108-116.
- Kaskous, S., Grun, E., Gottschalk, J., & Hippel, T. (2003)b. The behavior of lactogenic and steroid hormones in the blood of Awassi ewes in Syria during lactation. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 116(3-4), 117-123.
- Kim, A., Roffler-Tarlov, S., & Lin, C. S. (1995). New technique for precise alignment of an RNA differential display gel with its film image. *Biotechniques*, 19(3), 346.
- Kim, D. G. (2006). Differentially expressed genes associated with hepatitis B virus HBx and MHBs protein function in hepatocellular carcinoma. *Methods Mol Biol*, 317, 141-155.
- Kim, S., Choi, Y., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. (2003). Identification of genes in the ovine endometrium regulated by interferon tau independent of signal transducer and activator of transcription 1. *Endocrinology*, 144(12), 5203-5214.
- Kindler, S., Wang, H., Richter, D., & Tiedge, H. (2005). RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 223-245.
- Kingsley-Kallesen, M., Mukhopadhyay, S. S., Wyszomierski, S. L., Schanler, S., Schutz, G., & Rosen, J. M. (2002). The mineralocorticoid receptor may compensate for the loss of the



- glucocorticoid receptor at specific stages of mammary gland development. *Mol Endocrinol*, 16(9), 2008-2018.
- Kloc, M., & Bilinski, S. M. (2003). RNA localization and its role in the spatially restricted protein synthesis. *Folia Histochem Cytobiol*, 41(1), 3-11.
- Kociok, N., Unfried, K., Esser, P., Krott, R., Schraermeyer, U., & Heimann, K. (1998). The nonradioisotopic representation of differentially expressed mRNA by a combination of RNA fingerprinting and differential display. *Mol Biotechnol*, 9(1), 25-33.
- Kondrashov, F. A., & Koonin, E. V. (2001). Origin of alternative splicing by tandem exon duplication. *Hum Mol Genet*, 10(23), 2661-2669.
- Korenberg, J. R., Chen, X. N., Adams, M. D., & Venter, J. C. (1995). Toward a cDNA map of the human genome. *Genomics*, 29(2), 364-370.
- Kostadinov, R., Malhotra, N., Viotti, M., Shine, R., D'Antonio, L., & Bagga, P. (2006). GRSDb: a database of quadruplex forming G-rich sequences in alternatively processed mammalian pre-mRNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue), D119-124.
- Kothapalli, R., Yoder, S. J., Mane, S., & Loughran, T. P., Jr. (2002). Microarray results: how accurate are they? *BMC Bioinformatics*, 3, 22.
- Kühn, C., Freyer G., Weikard R., Goldammer T., & Schwerin, M. (1999). Detection of QTL or milk production traits in cattle by application of a specifically developed marker map of BAT6. *Anim. Genet.*, 30, 333-340.
- LaBaer, J., & Ramachandran, N. (2005). Protein microarrays as tools for functional proteomics. *Curr Opin Chem Biol*, 9(1), 14-19.
- Lazarou, M., McKenzie, M., Ohtake, A., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2007). Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Mol Cell Biol*, 27(12), 4228-4237.
- Lebel, M., Agarwal, P., Cheng, C. W., Kabir, M. G., Chan, T. Y., Thanabalasingham, V., Zhang, X., Cohen, D. R., Husain, M., Cheng, S. H., Bruneau, B. G., & Hui, C. C. (2003). The Iroquois homeobox gene *Irx2* is not essential for normal development of the heart and midbrain-hindbrain boundary in mice. *Mol Cell Biol*, 23(22), 8216-8225.
- Legarra, A., Ugarte, E., & Beltran de Heredia, I. (2004). An analysis of the relationship between the PrP genotype and milk yield in Lacho sheep. Paper presented at the ITEA Produccion Animal 3, 127-133.
- Leitner, G., Chaffer, M., Shamay, A., Shapiro, F., Merin, U., Ezra, E., Saran, A., & Silanikove, N. (2004). Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *J Dairy Sci*, 87(1), 46-52.

- Lekanne Deprez, R. H., Fijnvandraat, A. C., Ruijter, J. M., & Moorman, A. F. (2002). Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem*, 307(1), 63-69.
- Lemkin, P. F., Thornwall, G. C., Walton, K. D., & Hennighausen, L. (2000). The microarray explorer tool for data mining of cDNA microarrays: application for the mammary gland. *Nucleic Acids Res*, 28(22), 4452-4459.
- Lemon, B., & Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*, 14(20), 2551-2569.
- Lenasi, T., Kokalj-Vokac, N., Narat, M., Baldi, A., & Dovc, P. (2005). Functional study of the equine beta-casein and kappa-casein gene promoters. *J Dairy Res*, 72 Spec No, 34-43.
- Leroux, C., Le Provost, F., Petit, E., Bernard, L., Chilliard, Y., & Martin, P. (2003). Real-time RT-PCR and cDNA macroarray to study the impact of the genetic polymorphism at the alphas1-casein locus on the expression of genes in the goat mammary gland during lactation. *Reprod Nutr Dev*, 43(5), 459-469.
- Leroux, C., Mazure, N., & Martin, P. (1992). Mutations away from splice site recognition sequences might cis-modulate alternative splicing of goat alpha s1-casein transcripts. Structural organization of the relevant gene. *J Biol Chem*, 267(9), 6147-6157.
- Lettieri, T. (2006). Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ Health Perspect*, 114(1), 4-9.
- Lewis, B. (2001). *Genes VII: Marbán, S.L.*
- Li, C., Chen, Y., Wang, C., & Li, J. (2006). Cloning and analysis of differentially expressed ESTs in swine muscle tissue. *Sci China C Life Sci*, 49(4), 342-348.
- Li, J., Pankratz, M., & Johnson, J. A. (2002). Differential gene expression patterns revealed by oligonucleotide versus long cDNA arrays. *Toxicol Sci*, 69(2), 383-390.
- Li, L., Luan, Y., Li, X., Tang, B., Zhang, W., Li, D., Zhao, J., Wang, G., Ding, H., Reed, E., & Li, Q. Q. (2005). Demonstration of differential gene expression between sensitive and resistant ovarian tumor cells by fluorescence differential display-PCR analysis. *Oncol Rep*, 13(5), 793-799.
- Li, P., Barraclough, R., Fernig, D. G., Smith, J. A., & Rudland, P. S. (1998). Stem cells in breast epithelia. *Int J Exp Pathol*, 79(4), 193-206.
- Li, R. W., Meyer, M. J., Van Tassell, C. P., Sonstegard, T. S., Connor, E. E., Van Amburgh, M. E., Boisclair, Y. R., & Capuco, A. V. (2006). Identification of estrogen-responsive genes in the parenchyma and fat pad of the bovine mammary gland by microarray analysis. *Physiol Genomics*, 27(1), 42-53.

- Li, Y., & Rosen, J. M. (2005). Stem/progenitor cells in mouse mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 10(1), 17-24.
- Liang, P. (1998). Factors ensuring successful use of differential display. *Methods*, 16(4), 361-364.
- Liang, P. (2000). Gene Discovery Using differential display. *Genetic Engineering News*, 2037.
- Liang, P. (2002). A decade of differential display. *Biotechniques*, 33(2), 338-344, 346.
- Liang, P. (2006). From differential display to DNA microarrays--a personal account. *J Cell Physiol*, 209(3), 653-658.
- Liang, P., Averboukh, L., Keyomarsi, K., Sager, R., & Pardee, A. B. (1992). Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 52(24), 6966-6968.
- Liang, P., Averboukh, L., & Pardee, A. B. (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res*, 21(14), 3269-3275.
- Liang, P., Bauer, D., Averboukh, L., Warthoe, P., Rohrwild, M., Muller, H., Strauss, M., & Pardee, A. B. (1995). Analysis of altered gene expression by differential display. *Methods Enzymol*, 254, 304-321.
- Liang, P., Meade, J. D., & Pardee, A. B. (2007). A protocol for differential display of mRNA expression using either fluorescent or radioactive labeling. *Nat Protoc*, 2(3), 457-470.
- Liang, P., & Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257(5072), 967-971.
- Liang, P., & Pardee, A. B. (1997). Differential display. A general protocol. *Methods Mol Biol*, 85, 3-11.
- Liang, P., & Pardee, A. B. (2003). Analysing differential gene expression in cancer. *Nat Rev Cancer*, 3(11), 869-876.
- Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R. P., Averboukh, L., Wang, F., & Pardee, A. B. (1994). Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res*, 22(25), 5763-5764.
- Liang, S., Rossby, S. P., Liang, P., Shelton, R. C., Manier, D. H., Chakrabarti, A., & Sulser, F. (2006). Detection of an mRNA polymorphism by differential display. *Methods Mol Biol*, 317, 279-285.
- Lievens, S., Goormachtig, S., & Holsters, M. (2001). A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. *Nucleic Acids Res*, 29(17), 3459-3468.

- Lindberg, G. L., Shank, B. B., Rothschild, M. F., Mayfield, J. E., Freeman, A. E., Koehler, C. M., & Beitz, D. C. (1989). Characteristics of mammary mitochondria in lines of mice genetically divergent for milk production. *J Dairy Sci*, 72(5), 1175-1181.
- Lipshitz, H. D., & Smibert, C. A. (2000). Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 10(5), 476-488.
- Little, E. M., & Holt, C. (2004). An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein phosphopeptides. *Eur Biophys J*, 33(5), 435-447.
- Liu, S. F., Du, L. X., Zhu, J., Wang, A. H., & Li, H. B. (2004). [Optimizing the reaction system of DDRT-PCR by positive-cross test]. *Yi Chuan*, 26(6), 836-840.
- Lloyd, D., & Murray, D. B. (2006). The temporal architecture of eukaryotic growth. *FEBS Lett*, 580(12), 2830-2835.
- Lock, A. L., Teles, B. M., Perfield, J. W., 2nd, Bauman, D. E., & Sinclair, L. A. (2006). A conjugated linoleic acid supplement containing trans-10, cis-12 reduces milk fat synthesis in lactating sheep. *J Dairy Sci*, 89(5), 1525-1532.
- Lohmann, J., Schickle, H., & Bosch, T. C. (1995). REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Biotechniques*, 18(2), 200-202.
- Loitsch, S. M., Kippenberger, S., Dauletbaev, N., Wagner, T. O., & Bargon, J. (1999). Reverse transcription-competitive multiplex PCR improves quantification of mRNA in clinical samples--application to the low abundance CFTR mRNA. *Clin Chem*, 45(5), 619-624.
- Lollivier, V., Marnet, P. G., Delpal, S., Rainteau, D., Achard, C., Rabot, A., & Ollivier-Bousquet, M. (2006). Oxytocin stimulates secretory processes in lactating rabbit mammary epithelial cells. *J Physiol*, 570(Pt 1), 125-140.
- Lorkowski, S., & Cullen, P. (2003). *Analysing Gene Expression- A Handbook of Methods Possibilities and Pitfalls (Vol. I & II): WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim.*
- Lotan, R., Bar-On, V. G., Harel-Sharvit, L., Duek, L., Melamed, D., & Choder, M. (2005). The RNA polymerase II subunit Rpb4p mediates decay of a specific class of mRNAs. *Genes Dev*, 19(24), 3004-3016.
- Luce, M. J., & Burrows, P. D. (1998). Minimizing false positives in differential display. *Biotechniques*, 24(5), 766-768, 770.
- Luehrsen, K. R., Marr, L. L., van der Knaap, E., & Cumberledge, S. (1997). Analysis of differential display RT-PCR products using fluorescent primers and GENESCAN software. *Biotechniques*, 22(1), 168-174.

- Luster, T. A., & Rizzino, A. (2003). Regulation of the FGF-4 gene by a complex distal enhancer that functions in part as an enhanceosome. *Gene*, 323, 163-172.
- Maass, N., Nagasaki, K., Ziebart, M., Mundhenke, C., & Jonat, W. (2002). Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 3(4), 281-287.
- Maillard, J. C., Berthier, D., Thevenon, S., Piquemal, D., Chantal, I., & Marti, J. (2005). Efficiency and limits of the Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) method: discussions based on first results in bovine trypanotolerance. *Vet Immunol Immunopathol*, 108(1-2), 59-69.
- Maillard, J. C., Berthier, D., Thevenon, S., Quere, R., Piquemal, D., Manchon, L., & Marti, J. (2004). Use of the Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) method in veterinary research: A concrete application in the study of the bovine trypanotolerance genetic control. *Ann N Y Acad Sci*, 1026, 171-182.
- Malhotra, K., Foltz, L., Mahoney, W. C., & Schueler, P. A. (1998). Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 26(3), 854-856.
- Malveiro, E., Pereira, M., Marques, P. X., Santos, I. C., Belo, C., Renaville, R., & Cravador, A. (2001). Polymorphisms at the five exons of the growth hormone gene in the algarvia goat: possible association with milk traits. *Small Rumin Res*, 41(2), 163-170.
- Maniatis, T. (1991). Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Science*, 251(4989), 33-34.
- Maniatis, T., & Tasic, B. (2002). Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature*, 418(6894), 236-243.
- Marcos-Carcavilla, A., Calvo, J. H., Gonzalez, C., Moazami-Goudarzi, K., Laurent, P., Bertaud, M., Hayes, H., Beattie, A. E., Serrano, C., Lyahyai, J., Martin-Burriel, I., Alves, E., Zaragoza, P., Badiola, J. J., & Serrano, M. (2007). IL-1 family members as candidate genes modulating scrapie susceptibility in sheep: localization, partial characterization, and expression. *Mamm Genome*, 18(1), 53-63.
- Marques, M. R., Santos, I. C., Belo, C. C., & Cravador, A. (2001). Associations between SSCPs in the GH gene and milk traits in Serra da Estrela ewes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 5, 57.
- Marques, P.X., Pereira, M., Marques, M.R., Santos, I.C, Belo, C.C., Renaville, R. & Cravador, A. (2003). Association of milk traits with SSCP polymorphisms at the growth hormone gene in the Serrana goat. *Small Ruminant Research*. 50, 177-185.

## Bibliografia

- Marques, M. R., Santos, I. C., Carolino, N., Belo, C. C., & Cravador, A. (2006)a. Effects of ovine GH variants on ewe milk yield. Paper presented at the Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, August 13-18.
- Marques, M. R., Santos, I. C., Carolino, N., Belo, C. C., & Cravador, A. (2006)b. Effect of growth hormone gene copy number in milk yield in Serra da Estrela ovine breed. Paper presented at the 30th International Conference on Animal Genetics, Porto Seguro, Brasil. August 20-25.
- Marques, M. R., Santos, I. C., Carolino, N., Belo, C. C., Renaville, R., & Cravador, A. (2006)c. Effects of genetic polymorphisms at the growth hormone gene on milk yield in Serra da Estrela sheep. *Journal of Dairy Research*, 73, 394–405.
- Marquis, S. T., Rajan, J. V., Wynshaw-Boris, A., Xu, J., Yin, G. Y., Abel, K. J., Weber, B. L., & Chodosh, L. A. (1995). The developmental pattern of *Brcal* expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nat Genet*, 11(1), 17-26.
- Martin, K. J., Kwan, C. P., & Sager, R. (1997). A direct-sequencing-based strategy for identifying and cloning cDNAs from differential display gels. *Methods Mol Biol*, 85, 77-85.
- Martínez-Arribas, F., Agudo, D., Pollan, M., Gomez-Esquer, F., Diaz-Gil, G., Lucas, R., & Schneider, J. (2006). Positive correlation between the expression of X-chromosome RBM genes (*RBMX*, *RBM3*, *RBM10*) and the proapoptotic *Bax* gene in human breast cancer. *J Cell Biochem*, 97(6), 1275-1282.
- Master, S. R., Hartman, J. L., D'Cruz, C. M., Moody, S. E., Keiper, E. A., Ha, S. I., Cox, J. D., Belka, G. K., & Chodosh, L. A. (2002). Functional microarray analysis of mammary organogenesis reveals a developmental role in adaptive thermogenesis. *Mol Endocrinol*, 16(6), 1185-1203.
- Masuyama, K., Taniguchi, I., Kataoka, N., & Ohno, M. (2004). SR proteins preferentially associate with mRNAs in the nucleus and facilitate their export to the cytoplasm. *Genes Cells*, 9(10), 959-965.
- Mathieu-Daude, F., Trenkle, T., Welsh, J., Jung, B., Vogt, T., & McClelland, M. (1999). Identification of differentially expressed genes using RNA fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, 303, 309-324.
- Matusik, R. J., & Rosen, J. M. (1980). Prolactin regulation of casein gene expression: possible mediators. *Endocrinology*, 106(1), 252-259.
- Matz, M. V., & Lukyanov, S. A. (1998). Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res*, 26(24), 5537-5543.

- Mauger, E., & Scott, P. H. (2004). Mitogenic stimulation of transcription by RNA polymerase III. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 6), 976-977.
- Mayer, R. J. (1978). Hormonal factors in lipogenesis in mammary gland. *Vitam Horm*, 36, 101-163.
- McClelland, M., Mathieu-Daude, F., & Welsh, J. (1995). RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet*, 11(6), 242-246.
- McFadden, T. B., Akers, R. M., & Beal, W. E. (1989). Influence of breed and hormones on production of milk proteins by mammary explants from prepubertal heifers. *J Dairy Sci*, 72(7), 1754-1763.
- McKusick, B. C., Thomas, D. L., & Berger, Y. M. (2001). Effect of weaning system on commercial milk production and lamb growth of East Friesian dairy sheep. *J Dairy Sci*, 84(7), 1660-1668.
- Meade, J. D., Cho, Y. J., Fisher, J. S., Walden, J. C., Guo, Z., & Liang, P. (2006). Automation of fluorescent differential display with digital readout. *Methods Mol Biol*, 317, 23-57.
- Mercier, J. C., & Vilotte, J. L. (1993). Structure and function of milk protein genes. *J Dairy Sci*, 76(10), 3079-3098.
- Miele, G., MacRae, L., McBride, D., Manson, J., & Clinton, M. (1998). Elimination of false positives generated through PCR re-amplification of differential display cDNA. *Biotechniques*, 25(1), 138-144.
- Milenkovic, D., Martin, P., Guerin, G., & Leroux, C. (2002). A specific pattern of splicing for the horse alphaS1-Casein mRNA and partial genomic characterization of the relevant locus. *Genet Sel Evol*, 34(4), 509-519.
- Milligan, L., Torchet, C., Allmang, C., Shipman, T., & Tollervey, D. (2005). A nuclear surveillance pathway for mRNAs with defective polyadenylation. *Mol Cell Biol*, 25(22), 9996-10004.
- Moeller, R., & Fritzsche, W. (2005). Chip-based electrical detection of DNA. *IEE Proc Nanobiotechnol*, 152(1), 47-51.
- Mohr, E., & Richter, D. (2001). Messenger RNA on the move: implications for cell polarity. *Int J Biochem Cell Biol*, 33(7), 669-679.
- Moioli, B., Contarini, G., Avalli, A., Catillo, G., Orru, L., De Matteis, G., Masoero, G., & Napolitano, F. (2007). Short communication: Effect of stearoyl-coenzyme A desaturase polymorphism on fatty acid composition of milk. *J Dairy Sci*, 90(7), 3553-3558.
- Molenaar, A. J., Wheeler, T. T., & Grigor, M. R. (2000). Nuclear localisation of the transcription factor Stat5b is associated with ovine milk protein gene expression during lactation but not during late pregnancy or forced weaning. *Histochem J*, 32(5), 265-274.

- Molofsky, A. V., Pardal, R., & Morrison, S. J. (2004). Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol*, 16(6), 700-707.
- Monroy, G., Rola, F. H., & Pullman, M. E. (1972). A substrate- and position-specific acylation of sn-glycerol 3-phosphate by rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 247(21), 6884-6894.
- Montgomery, M. K. (2004). The use of double-stranded RNA to knock down specific gene activity. *Methods Mol Biol*, 260, 129-144.
- Moreno, J. C., Pauws, E., van Kampen, A. H., Jedlickova, M., de Vijlder, J. J., & Ristalpers, C. (2001). Cloning of tissue-specific genes using serial analysis of gene expression and a novel computational subtraction approach. *Genomics*, 75(1-3), 70-76.
- Morris, S. A., Shibata, Y., Noma, K., Tsukamoto, Y., Warren, E., Temple, B., Grewal, S. I., & Strahl, B. D. (2005). Histone H3 K36 methylation is associated with transcription elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*, 4(8), 1446-1454.
- Motlik, J., Carnwath, J. W., Herrmann, D., Terletski, V., Anger, M., & Niemann, H. (1998). Automated recording of RNA differential display patterns from pig granulosa cells. *Biotechniques*, 24(1), 148-153.
- Müller, F., & Tora, L. (2004). The multicoloured world of promoter recognition complexes. *Embo J*, 23(1), 2-8.
- Muñoz, E., C., . (2003). Razas Ganaderas Españolas. II. Ovinas. (Vol. II).
- Nakamura, M., Tomita, A., Nakatani, H., Matsuda, T., & Nadano, D. (2006). Antioxidant and antibacterial genes are upregulated in early involution of the mouse mammary gland: sharp increase of ceruloplasmin and lactoferrin in accumulating breast milk. *DNA Cell Biol*, 25(9), 491-500.
- Nakanishi, T., Kubota, H., Ishibashi, N., Kumagai, S., Watanabe, H., Yamashita, M., Kashiwabara, S., Miyado, K., & Baba, T. (2006). Possible role of mouse poly(A) polymerase mGLD-2 during oocyte maturation. *Dev Biol*, 289(1), 115-126.
- Naylor, M. J., Oakes, S. R., Gardiner-Garden, M., Harris, J., Blazek, K., Ho, T. W., Li, F. C., Wynick, D., Walker, A. M., & Ormandy, C. J. (2005). Transcriptional changes underlying the secretory activation phase of mammary gland development. *Mol Endocrinol*, 19(7), 1868-1883.
- Neilson, L., Andalibi, A., Kang, D., Coutifaris, C., Strauss, J. F., 3rd, Stanton, J. A., & Green, D. P. (2000). Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. *Genomics*, 63(1), 13-24.
- Neville, M. C., McFadden, T. B., & Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7(1), 49-66.



- Nishimura, T., & Kohmoto, K. (2001). Regulation of glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1 (GlyCAM-1) gene in the mouse mammary gland differs from that of casein genes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 129(1), 149-156.
- Odeberg, J., Wood, T., Blucher, A., Rafter, J., Norstedt, G., & Lundeberg, J. (2000). A cDNA RDA protocol using solid-phase technology suited for analysis in small tissue samples. *Biomol Eng*, 17(1), 1-9.
- Ogbourne, S., & Antalis, T. M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J*, 331 ( Pt 1), 1-14.
- Onorato, T. M., Chakraborty, S., & Haldar, D. (2005). Phosphorylation of rat liver mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase by casein kinase 2. *J Biol Chem*, 280(20), 19527-19534.
- Onorato, T. M., & Haldar, D. (2002). Casein kinase II stimulates rat liver mitochondrial glycerophosphate acyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 296(5), 1091-1096.
- Ontsouka, E. C., Korczak, B., Hammon, H. M., & Blum, J. W. (2004). Real-time PCR quantification of bovine lactase mRNA: localization in the gastrointestinal tract of milk-fed calves. *J Dairy Sci*, 87(12), 4230-4237.
- Orlowski, J., & Grinstein, S. (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch*, 447(5), 549-565.
- Orlowski, J., & Grinstein, S. (2007). Emerging roles of alkali cation/proton exchangers in organellar homeostasis. *Curr Opin Cell Biol*, 19(4), 483-492.
- Othmane, M. H., Carriedo, J. A., San Primitivo, F., & De La Fuente, L. F. (2002)a. Genetic parameters for lactation traits of milking ewes: protein content and composition, fat, somatic cells and individual laboratory cheese yield. *Genet Sel Evol*, 34(5), 581-596.
- Othmane, M. H., De La Fuente, L. F., Carriedo, J. A., & San Primitivo, F. (2002)b. Heritability and genetic correlations of test day milk yield and composition, individual laboratory cheese yield, and somatic cell count for dairy ewes. *J Dairy Sci*, 85(10), 2692-2698.
- Paradiso, A., Cardone, R. A., Bellizzi, A., Bagorda, A., Guerra, L., Tommasino, M., Casavola, V., & Reshkin, S. J. (2004). The Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger-1 induces cytoskeletal changes involving reciprocal RhoA and Rac1 signaling, resulting in motility and invasion in MDA-MB-435 cells. *Breast Cancer Res*, 6(6), R616-628.
- Pardinas, J. R., Combates, N. J., Prouty, S. M., Stenn, K. S., & Parimoo, S. (1998). Differential subtraction display: a unified approach for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Anal Biochem*, 257(2), 161-168.

- Pariset, L., Cappuccio, I., Joost, S., D'Andrea, M., Marletta, D., Ajmone Marsan, P., & Valentini, A. (2006). Characterization of single nucleotide polymorphisms in sheep and their variation as evidence of selection. *Anim Genet*, 37(3), 290-292.
- Park, J. W., & Graveley, B. R. (2005). Use of RNA interference to dissect the roles of trans-acting factors in alternative pre-mRNA splicing. *Methods*, 37(4), 341-344.
- Park, Y.W., Ju'arez, M., Ramos, M. & Haenlein, G. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88–113.
- Pastorian, K., Hawel, L., 3rd, & Byus, C. V. (2000). Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem*, 283(1), 89-98.
- Pathak, B. G., Shull, G. E., Jenkins, N. A., & Copeland, N. G. (1996). Mouse chromosomal location of four Na/H exchanger isoform genes. *Genomics*, 31(2), 261-263.
- Pathak, R. U., & Kanungo, M. S. (2007). Subtractive differential display: a modified differential display technique for isolating differentially expressed genes. *Mol Biol Rep*, 34(1), 41-46.
- Pauku, K., & Silvennoinen, O. (2004). STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(6), 435-455.
- Pauloin A., Rogel-Gaillard C., Piumi F., Hayes H., F. M. L., Chanut E., Chardon P., & Devinoy, E. (2002). Structure of the rabbit alphas1- and beta-casein gene cluster, assignment to chromosome 15 and expression of the alphas1-casein gene in HC11 cells. *Gene* 283(1-2), 155-162.
- Pennetier, S., Uzbekova, S., Guyader-Joly, C., Humblot, P., Mermillod, P., & Dalbies-Tran, R. (2005). Genes preferentially expressed in bovine oocytes revealed by subtractive and suppressive hybridization. *Biol Reprod*, 73(4), 713-720.
- Peters, D. G., Kassam, A. B., Yonas, H., O'Hare, E. H., Ferrell, R. E., & Brufsky, A. M. (1999). Comprehensive transcript analysis in small quantities of mRNA by SAGE-lite. *Nucleic Acids Res*, 27(24), e39.
- Peterson, D. G., Matitashvili, E. A., & Bauman, D. E. (2003). Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J Nutr*, 133(10), 3098-3102.
- Pienta, K. J., & Schwab, E. D. (2000). Modified differential display technique that eliminates radioactivity and decreases screening time. *Biotechniques*, 28(2), 272-274, 276-277.

- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., & Filipowicz, W. (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol*, 17(3), 118-126.
- Pinelli, F., Scimonelli, M., Oltenacu, P. A., Vitale, F., Vitale, M., D'Amico, A., Caracappa, S., & Carlucci, A. (2006). Association between PrP genotype and milk performance in Comisana sheep breed. Paper presented at the Eighth World Congress. *Genet. Appl. Livest. Prod.*, Belo-Horizonte, Brazil (CD-ROM communication 02-10).
- Pirisi, A., Piredda, G., Papoff, C. M., Di Salvo, R., Pintus, S., Garro, G., Ferranti, P., & Chianese, L. (1999). Effects of sheep alpha s1-casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties. *J Dairy Res*, 66(3), 409-419.
- Pirrotta, V. (2002). Trans-splicing in *Drosophila*. *Bioessays*, 24(11), 988-991.
- Pizzonia, J. H., Biemesderfer, D., Abu-Alfa, A. K., Wu, M. S., Exner, M., Isenring, P., Igarashi, P., & Aronson, P. S. (1998). Immunochemical characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE4. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 2), F510-517.
- Ponsuksili, S., Wimmers, K., & Schellander, K. (2001). Application of differential display RT-PCR to identify porcine liver ESTs. *Gene*, 280(1-2), 75-85.
- Potts, J. K., Echtenkamp, S. E., Smith, T. P., & Reecy, J. M. (2003). Characterization of gene expression in double-muscled and normal-muscled bovine embryos. *Anim Genet*, 34(6), 438-444.
- Prieto, J. L., & McStay, B. (2005). Nucleolar biogenesis: the first small steps. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 6), 1441-1443.
- Ramunno, L., Cosenza, G., Rando, A., Illario, R., Gallo, D., Di Berardino, D., & Masina, P. (2004). The goat alpha s1-casein gene: gene structure and promoter analysis. *Gene*, 334, 105-111.
- Reichardt, H. M., Horsch, K., Grone, H. J., Kolbus, A., Beug, H., Hynes, N., & Schutz, G. (2001). Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *Eur J Endocrinol*, 145(4), 519-527.
- Reinhardt, B., Frank, U., Gellner, K., Lohmann, J. U., & Bosch, T. C. (1999). High-resolution, fluorescence-based differential display on a DNA sequencer followed by band excision. *Biotechniques*, 27(2), 268-271.
- Reinhardt, T. A., & Horst, R. L. (1999). Ca<sup>2+</sup>-ATPases and their expression in the mammary gland of pregnant and lactating rats. *Am J Physiol*, 276(4 Pt 1), C796-802.
- Richmond, C. S., Glasner, J. D., Mau, R., Jin, H., & Blattner, F. R. (1999). Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res*, 27(19), 3821-3835.
- Rijnkels, M. (2002). Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7(3), 327-345.

- Rijnkels, M., Elnitski, L., Miller, W., & Rosen, J. M. (2003). Multispecies comparative analysis of a mammalian-specific genomic domain encoding secretory proteins. *Genomics*, 82(4), 417-432.
- Rody, A., Karn, T., Gatje, R., Kourtis, K., Minckwitz, G., Loibl, S., Munnes, M., Ruckhaberle, E., Holtrich, U., Kaufmann, M., & Ahr, A. (2006). Gene expression profiles of breast cancer obtained from core cut biopsies before neoadjuvant docetaxel, adriamycin, and cyclophosphamide chemotherapy correlate with routine prognostic markers and could be used to identify predictive signatures. *Zentralbl Gynakol*, 128(2), 76-81.
- Rogler, C. E., Tchaikovskaya, T., Norel, R., Massimi, A., Plescia, C., Rubashevsky, E., Siebert, P., & Rogler, L. E. (2004). RNA expression microarrays (REMs), a high-throughput method to measure differences in gene expression in diverse biological samples. *Nucleic Acids Res*, 32(15), 120.
- Rompf, R., & Kahl, G. (1997). mRNA differential display in agarose gels. *Biotechniques*, 23(1), 28, 30, 32.
- Ron, M., Israeli, G., Seroussi, E., Weller, J. I., Gregg, J. P., Shani, M., & Medrano, J. F. (2007). Combining mouse mammary gland gene expression and comparative mapping for the identification of candidate genes for QTL of milk production traits in cattle. *BMC Genomics*, 8, 183.
- Roncada, P., Gaviraghi, A., Liberatori, S., Canas, B., Bini, L., & Greppi, G. F. (2002). Identification of caseins in goat milk. *Proteomics*, 2(6), 723-726.
- Rosano, T. G., & Jones, D. H. (1976)a. Developmental changes in mitochondria during the transition into lactation in the mouse mammary gland. *J Cell Biol*, 69(3), 573-580.
- Rosano, T. G., Lee, S. K., & Jones, D. H. (1976)b. Developmental changes in mitochondria during the transition into lactation in the mouse mammary gland. II. Membrane marker enzymes and membrane ultrastructure. *J Cell Biol*, 69(3), 581-588.
- Rosen, J. M. (2003). Transcription factors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 8(2), 143-144.
- Rosen, J. M., Li, S., Raught, B., & Hadsell, D. (1996). The mammary gland as a bioreactor: factors regulating the efficient expression of milk protein-based transgenes. *Am J Clin Nutr*, 63(4), 627S-632S.
- Rosen, J. M., Wyszomierski, S. L., & Hadsell, D. (1999). Regulation of milk protein gene expression. *Annu Rev Nutr*, 19, 407-436.
- Rosok, O., Odeberg, J., Rode, M., Stokke, T., Funderud, S., Smeland, E., & Lundeberg, J. (1996). Solid-phase method for differential display of genes expressed in hematopoietic stem cells. *Biotechniques*, 21(1), 114-121.
- Ross, J. (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev*, 59(3), 423-450.

- Roussa, E., Alper, S. L., & Thevenod, F. (2001). Immunolocalization of anion exchanger AE2, Na(+)/H(+) exchangers NHE1 and NHE4, and vacuolar type H(+)-ATPase in rat pancreas. *J Histochem Cytochem*, 49(4), 463-474.
- Roy, R., Gautier, M., Hayes, H., Laurent, P., Zaragoza, P., Eggen, A., & Rodellar, C. (2002). Assignment of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) gene to bovine chromosome 26 (26q22) by in situ hybridization and confirmation by somatic cell hybrid mapping. *Cytogenet Genome Res*, 97(3-4), 276F.
- Roy, R., Ordovas, L., Taourit, S., Zaragoza, P., Eggen, A., & Rodellar, C. (2006). Genomic structure and an alternative transcript of bovine mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene (GPAM). *Cytogenet Genome Res*, 112(1-2), 82-89.
- Roy, S., & Sen, C. K. (2006). cDNA microarray screening in food safety. *Toxicology*, 221(1), 128-133.
- Rudland, P. S., & Barraclough, R. (1988). Stem cells in mammary gland differentiation and cancer. *J Cell Sci Suppl*, 10, 95-114.
- Rudolph, M. C., McManaman, J. L., Hunter, L., Phang, T., & Neville, M. C. (2003). Functional development of the mammary gland: use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 8(3), 287-307.
- Sacristán, A. G., Montijano, F. C., Palomino, L. F., Gallego, J. G., Silanes, M. D. M. L., & Ruiz, G. S. (1998). *Fisiología Veterinaria*. McGraw-Hill.
- Saggerson, E. D., Carpenter, C. A., Cheng, C. H., & Sooranna, S. R. (1980). Subcellular distribution and some properties of N-ethylmaleimide-sensitive and-insensitive forms of glycerol phosphate acyltransferase in rat adipocytes. *Biochem J*, 190(1), 183-189.
- Saji, S., Sakaguchi, H., Andersson, S., Warner, M., & Gustafsson, J. (2001). Quantitative analysis of estrogen receptor proteins in rat mammary gland. *Endocrinology*, 142(7), 3177-3186.
- Salaris, S., Casu, S., & Carta, A. (2006). Relationships between the PrP locus and milk yield and udder morphology traits in Sarda sheep. Paper presented at the Eighth World Congress. *Genet. Appl. Livest. Prod.*, Belo-Horizonte, Brazil (CD-ROM communication 2-11).
- Salicioni, A. M., Xi, M., Vanderveer, L. A., Balsara, B., Testa, J. R., Dunbrack, R. L., Jr., & Godwin, A. K. (2000). Identification and structural analysis of human RBM8A and RBM8B: two highly conserved RNA-binding motif proteins that interact with OVCA1, a candidate tumor suppressor. *Genomics*, 69(1), 54-62.
- Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (3rd ed. Vol. I, II, III).

- Santana, F. A., Nunes, F. M., Vieira, C. U., Machado, M. A., Kerr, W. E., Silva, W. A., Jr., & Bonetti, A. M. (2006). Differentially displayed expressed sequence tags in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) development. *An Acad Bras Cienc*, 78(1), 69-75.
- Sardet, C., Franchi, A., & Pouyssegur, J. (1989). Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Cell*, 56(2), 271-280.
- Schams, D., Kohlenberg, S., Amselgruber, W., Berisha, B., Pfaffl, M. W., & Sinowatz, F. (2003). Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *Journal of Endocrinology*, 117, 305-317.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467-470.
- Schmidt, G. H. (1971). *Biology of Lactation*. (First ed.).
- Schmittgen, T. D., & Zakrajsek, B. A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*, 46(1-2), 69-81.
- Schrader, A. D., Iqbal, M. J., & Jones, K. L. (2003). Gene expression in cloned bovine fetal liver. *Cloning Stem Cells*, 5(1), 63-69.
- Schroeder, J. C., Bensen, J. T., Su, L. J., Mishel, M., Ivanova, A., Smith, G. J., Godley, P. A., Fontham, E. T., & Mohler, J. L. (2006). The North Carolina-Louisiana Prostate Cancer Project (PCaP): Methods and design of a multidisciplinary population-based cohort study of racial differences in prostate cancer outcomes. *Prostate*, 66(11):1162-76.
- Seely, K. A., & Aggeler, J. (1991). Modulation of milk protein synthesis through alteration of the cytoskeleton in mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane. *J Cell Physiol*, 146(1), 117-130.
- Schwerin, M., Czernek-Schafer, D., Goldammer, T., Kata, S. R., Womack, J. E., Pareek, R., Pareek, C., Walawski, K., & Brunner, R. M. (2003). Application of disease-associated differentially expressed genes--mining for functional candidate genes for mastitis resistance in cattle. *Genet Sel Evol*, 35 Suppl 1, S19-34.
- Seol, M. B., Bong, J. J., & Baik, M. (2005). Expression profiles of apoptosis genes in mammary epithelial cells. *Mol Cells*, 20(1), 97-104.
- Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M. L., Wu, L., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 439(7072), 84-88.

- Sharma, M. R., Koltowski, L., Ownbey, R. T., Tuszyński, G. P., & Sharma, M. C. (2006). Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: Selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Exp Mol Pathol*.
- Shealy, R. T., Murphy, A. D., Ramarathnam, R., Jakobsson, E., & Subramaniam, S. (2003). Sequence-function analysis of the K<sup>+</sup>-selective family of ion channels using a comprehensive alignment and the KcsA channel structure. *Biophys J*, 84(5), 2929-2942.
- Shennan, D. B., & Gow, I. F. (2000). Volume-activated K<sup>(+)</sup>(Rb<sup>(+)</sup>) efflux in lactating rat mammary tissue. *Biochim Biophys Acta*, 1509(1-2), 420-428.
- Shennan, D. B., & Thomson, J. (2004). Activation and inactivation of volume-sensitive taurine efflux from rat mammary gland. *Mol Cell Biochem*, 262(1-2), 111-118.
- Shilatifard, A. (1998). The RNA polymerase II general elongation complex. *Biol Chem*, 379(1), 27-31.
- Shilatifard, A. (2004). Transcriptional elongation control by RNA polymerase II: a new frontier. *Biochim Biophys Acta*, 1677(1-3), 79-86.
- Shilatifard, A. (2006). Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annu Rev Biochem*.
- Shivaswamy, S., Kassavetis, G. A., & Bhargava, P. (2004). High-level activation of transcription of the yeast U6 snRNA gene in chromatin by the basal RNA polymerase III transcription factor TFIIC. *Mol Cell Biol*, 24(9), 3596-3606.
- Sierra, G. F. (1995). Valoración Genética de la Morfología de la ubre en ganado ovino de aptitud láctea. Aplicación al programa de selección de la raza Churra. Universidad de León-Facultad de Veterinaria.
- Sievertzon, M., Nilsson, P., & Lundeberg, J. (2006). Improving reliability and performance of DNA microarrays. *Expert Rev Mol Diagn*, 6(3), 481-492.
- Silanikove, N., Shamay, A., Shinder, D., & Moran, A. (2000). Stress down regulates milk yield in cows by plasmin induced beta-casein product that blocks K<sup>+</sup> channels on the apical membranes. *Life Sci*, 67(18), 2201-2212.
- Sims, R. J., 3rd, Belotserkovskaya, R., & Reinberg, D. (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev*, 18(20), 2437-2468.
- Sjaastad, M. D., Zettl, K. S., Parry, G., Firestone, G. L., & Machen, T. E. (1993). Hormonal regulation of the polarized function and distribution of Na/H exchange and Na/HCO<sub>3</sub> cotransport in cultured mammary epithelial cells. *J Cell Biol*, 122(3), 589-600.
- Skarda, J., Bilek, J., & Urbanova, E. (1978). Induction of lipid synthesis in mammary organ cultures from mature virgin and pregnant goats. *Physiol Bohemoslov*, 27(1), 53-59.

- Skretting, G., Austbo, L., Olsaker, I., & Espenes, A. (2006). Cloning and expression analysis of an ovine PAP-like protein cDNA, a gene differentially expressed in scrapie. *Gene*, 5;376(1):116-22.
- Slepko, E. R., Rainey, J. K., Sykes, B. D., & Fliegel, L. (2007). Structural and functional analysis of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Biochem J*, 401(3), 623-633.
- Smith, G. H., & Chepko, G. (2001). Mammary epithelial stem cells. *Microsc Res Tech*, 52(2), 190-203.
- Smith, N. R., Aldersley, M., Li, A., High, A. S., Moynihan, T. P., Markham, A. F., & Robinson, P. A. (1997). Automated differential display using a fluorescently labeled universal primer. *Biotechniques*, 23(2), 274-279.
- Sokolov B.P., & Prockop, D. J. (1994). A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 22 (19), 4009-4015.
- Soo, C., Sayah, D. N., Zhang, X., Beanes, S. R., Nishimura, I., Dang, C., Freymiller, E., & Ting, K. (2002). The identification of novel wound-healing genes through differential display. *Plast Reconstr Surg*, 110(3), 787-797; discussion 798-800.
- Sørensen, E. S., Moller, L., Vinther, M., Petersen, T. E., & Rasmussen, L. K. (2003). The phosphorylation pattern of human alpha1-casein is markedly different from the ruminant species. *Eur J Biochem*, 270(17), 3651-3655.
- Soutoglou, E., & Talianidis, I. (2002). Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science*, 295(5561), 1901-1904.
- Spelman R.J., Coppieters W., Karim L., van Arendonk J.A., & Bovenhuis, H. (1996). Quantitative trait loci analysis for five milk production traits on chromosome six in the Dutch Holstein-Friesian population. *Genetics* 144, 1799-1808.
- Spencer, T. E., Stagg, A. G., Joyce, M. M., Jenster, G., Wood, C. G., Bazer, F. W., Wiley, A. A., & Bartol, F. F. (1999). Discovery and characterization of endometrial epithelial messenger ribonucleic acids using the ovine uterine gland knockout model. *Endocrinology*, 140(9), 4070-4080.
- Spielbauer, B., & Stahl, F. (2005). Impact of microarray technology in nutrition and food research. *Mol Nutr Food Res*, 49(10), 908-917.
- St. Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(5), 363-375.
- St. Johnston, D. (1995). Developmental biology. New role for tropomyosin. *Nature*, 377(6549), 483.
- Staton, J. M., Thomson, A. M., & Leedman, P. J. (2000). Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituitary. *J Mol Endocrinol*, 25(1), 17-34.



- Stein, S., Cho, Y. J., Jackson, R. S., 2nd, & Liang, P. (2003). Identification of p53 target genes by fluorescent differential display. *Methods Mol Biol*, 234, 51-63.
- Stein, J., & Liang, P. (2002)a. Differential display technology: a general guide. *Cell Mol Life Sci*, 59(8), 1235-1240.
- Stein, S., & Liang, P. (2002)b. Differential display analysis of gene expression in mammals: a p53 story. *Cell Mol Life Sci*, 59(8), 1274-1279.
- Stein, T., Morris, J. S., Davies, C. R., Weber-Hall, S. J., Duffy, M. A., Heath, V. J., Bell, A. K., Ferrier, R. K., Sandilands, G. P., & Gusterson, B. A. (2004). Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response, involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast Cancer Res*, 6(2), R75-91.
- Steitz, J. A. (1992). Splicing takes a holliday. *Science*, 257(5072), 888-889.
- Stoeckelhuber, M., Messmer, E. M., Schmidt, C., Xiao, F., Schubert, C., & Klug, J. (2006). Immunohistochemical analysis of secretoglobin SCGB 2A1 expression in human ocular glands and tissues. *Histochem Cell Biol*, 1-7.
- Stoecklin, E., Wissler, M., Schaetzle, D., Pfitzner, E., & Groner, B. (1999). Interactions in the transcriptional regulation exerted by Stat5 and by members of the steroid hormone receptor family. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69(1-6), 195-204.
- Stojdl, D. F., & Bell, J. C. (1999). SR protein kinases: the splice of life. *Biochem Cell Biol*, 77(4), 293-298.
- Storz, G., Altuvia, S., & Wassarman, K. M. (2005). An abundance of RNA regulators. *Annu Rev Biochem*, 74, 199-217.
- Struhl, K. (2001). Gene regulation. A paradigm for precision. *Science*, 293(5532), 1054-1055.
- Sturtevant, J. (2000). Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. *Clin Microbiol Rev*, 13(3), 408-427.
- Suchyta, S. P., Sipkovsky, S., Halgren, R. G., Kruska, R., Elftman, M., Weber-Nielsen, M., Vandehaar, M. J., Xiao, L., Tempelman, R. J., & Coussens, P. M. (2003). Bovine mammary gene expression profiling using a cDNA microarray enhanced for mammary-specific transcripts. *Physiol Genomics*, 16(1), 8-18.
- Sul, H. S., & Wang, D. (1998). Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu Rev Nutr*, 18, 331-351.
- Sun, H., Berquin, I. M., & Edwards, I. J. (2005). Omega-3 polyunsaturated fatty acids regulate syndecan-1 expression in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 65(10), 4442-4447.

- Sung, Y. J., & Denman, R. B. (1997). Use of two reverse transcriptases eliminates false-positive results in differential display. *Biotechniques*, 23(3), 462-464, 466, 468.
- Svennersten-Sjaunja, K., & Olsson, K. (2005). Endocrinology of milk production. *Domest Anim Endocrinol*, 29(2), 241-258.
- Svoboda, P. (2004). Long dsRNA and silent genes strike back:RNAi in mouse oocytes and early embryos. *Cytogenet Genome Res*, 105(2-4), 422-434.
- Szyda, J., & Komisarek, J. (2007). Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle. *Journal of dairy science*. 90(6), 2971-2979.
- Talapatra, A., Rouse, R., & Hardiman, G. (2002). Protein microarrays: challenges and promises. *Pharmacogenomics*, 3(4), 527-536.
- Talhok, R. S., Maa'ni, F. A., Kalaa'ni, N., Zoubian, G. S., Simaa'n, C. J., Abi-Sai'd, M., Hamadeh, S., Barbour, E., & El-Sabban, M. E. (2001). Partial purification and characterization of proteins with growth promoting activities from ovine mammary gland secretions. *Domest Anim Endocrinol*, 21(3), 143-159.
- Tan, P. K., Downey, T. J., Spitznagel, E. L., Jr., Xu, P., Fu, D., Dimitrov, D. S., Lempicki, R. A., Raaka, B. M., & Cam, M. C. (2003). Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res*, 31(19), 5676-5684.
- Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R. M., Elstner, M., Leesch, W., Jagodzinski, F. B., Stupak, D. P., Sugrue, M. M., & Tatton, N. A. (2000). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling. *J Neural Transm Suppl*(60), 77-100.
- Tekotte, H., & Davis, I. (2002). Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends Genet*, 18(12), 636-642.
- Terra. (2004). Características de la raza ovina Churra, servidor de Internet TERRA. <http://www.terra.es/personal/soportal/archivo/ovejach.html>.
- Tesfaye, D., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Gilles, M., & Schellander, K. (2003). Identification and quantification of differentially expressed transcripts in in vitro-produced bovine preimplantation stage embryos. *Mol Reprod Dev*, 66(2), 105-114.
- Tesfaye, D., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Gilles, M., & Schellander, K. (2004). A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced in vitro or in vivo. *Reprod Domest Anim*, 39(6), 396-404.
- To, K. Y. (2000). Identification of differential gene expression by high throughput analysis. *Comb Chem High Throughput Screen*, 3(3), 235-241.
- Tobon, H., & Salazar, H. (1975). Ultrastructure of the human mammary gland. II. Postpartum lactogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 40(5), 834-844.

- Tolic-Norrelykke, S. F., Engh, A. M., Landick, R., & Gelles, J. (2004). Diversity in the rates of transcript elongation by single RNA polymerase molecules. *J Biol Chem*, 279(5), 3292-3299.
- Tomas, A., Estelle, J., Clop, A., Gomez-Raya, L., Noguera, J. L., Sanchez, A., & Amills, M. (2003). Assignment of the mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) gene to porcine chromosome 14. *Anim Genet*, 34(5), 387.
- Tooker, B. C., & Coussens, P. M. (2004). Phagocytosis of *M. paratuberculosis* fails to activate expression of NADH dehydrogenase and nucleolin-related protein in bovine macrophages. *Immunol Lett*, 93(2-3), 137-142.
- Topper, Y. J., & Freeman, C. S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev*, 60(4), 1049-1106.
- Tourriere, H., Chebli, K., & Tazi, J. (2002). mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie*, 84(8), 821-837.
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S. A., & Orlando, C. (2002). Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem*, 309(2), 293-300.
- Tucker, H. A. (2000). Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. *J Dairy Sci*, 83(4), 874-884.
- Tuszynski, J. A., Carpenter, E. J., Huzil, J. T., Malinski, W., Luchko, T., & Luduena, R. F. (2006). The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *Int J Dev Biol*, 50(2-3), 341-358.
- Tuteja, R., & Tuteja, N. (2004)a. Serial analysis of gene expression (SAGE): application in cancer research. *Med Sci Monit*, 10(6), RA132-140.
- Tuteja, R., & Tuteja, N. (2004)b. Serial analysis of gene expression (SAGE): unraveling the bioinformatics tools. *Bioessays*, 26(8), 916-922.
- Tuteja, R., & Tuteja, N. (2004)c. Serial Analysis of Gene Expression: Applications in Human Studies. *J Biomed Biotechnol*, 2004(2), 113-120.
- Tzagoloff, A. (1982). *Mitochondria*. Plenum Press, New York.
- Ugarte, E., Serrano, M., De la Fuente, L. F., Pérez-Gusmán, M. D., Alfonso, L., & Gutierrez, J. P. (2002). Situación actual de los programas de mejora genética en ovino de leche. Paper presented at the XI reunión nacional de mejora genética animal, Pamplona (España).
- Ullu, E., Djikeng, A., Shi, H., & Tschudi, C. (2002). RNA interference: advances and questions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357(1417), 65-70.

- Uzbekova, S., Roy-Sabau, M., Dalbies-Tran, R., Perreau, C., Papillier, P., Mompert, F., Thelie, A., Pennetier, S., Cognie, J., Cadoret, V., Royere, D., Monget, P., & Mermillod, P. (2006). Zygote arrest 1 gene in pig, cattle and human: evidence of different transcript variants in male and female germ cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 12.
- Valinsky, A., Shani, M., & Gootwine, E. (1990). Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number. *Animal Biotechnology*, 1, 135–144.
- Van de Bor, V., & Davis, I. (2004). mRNA localisation gets more complex. *Curr Opin Cell Biol*, 16(3), 300-307.
- Van Kaam, J.B.C.H.M., Finocchiaro, R., Maizon, D. O., Vitale, M., Vitale, F., Caraccappa, S., & Portolano, B. (2006). Effect of the PrP gene on milk production in Valle Del Belice. Paper presented at the Eighth World Congres. Genet. Appl. Livest. Prod., Belo-Horizonte, Brazil (CD-ROM communication 2–12).
- Velculescu, V. E., & Kinzler, K. W. (2007). Gene expression analysis goes digital. *Nat Biotechnol*, 25(8), 878-880.
- Velculescu, V. E., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2000). Analysing uncharted transcriptomes with SAGE. *Trends Genet*, 16(10), 423-425.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*, 270(5235), 484-487.
- Verlinden, I., Gungor, N., Wouters, K., Janssens, J., Raus, J., & Michiels, L. (2005). Parity-induced changes in global gene expression in the human mammary gland. *Eur J Cancer Prev*, 14(2), 129-137.
- Vernon, R. G., Faulkner, A., Finley, E., Pollock, H., & Taylor, E. (1987). Enzymes of glucose and fatty acid metabolism of liver, kidney, skeletal muscle, adipose tissue and mammary gland of lactating and non-lactating sheep. *J Anim Sci*, 64(5), 1395-1411.
- Vernon, R. G., Finley, E., & Taylor, E. (1983). Adenosine and the control of lipolysis in rat adipocytes during pregnancy and lactation. *Biochem J*, 216(1), 121-128.
- Vilain, C., Libert, F., Venet, D., Costagliola, S., & Vassart, G. (2003). Small amplified RNA-SAGE: an alternative approach to study transcriptome from limiting amount of mRNA. *Nucleic Acids Res*, 31(6), e24.
- Virlon, B., Cheval, L., Buhler, J. M., Billon, E., Doucet, A., & Elalouf, J. M. (1999). Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), 15286-15291.
- Vogeli-Lange, R., Burckert, N., Boller, T., & Wiemken, A. (1996). Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. *Nucleic Acids Res*, 24(7), 1385-1386.

- von der Kammer, H., Albrecht, C., Mayhaus, M., Hoffmann, B., Stanke, G., & Nitsch, R. M. (1999). Identification of genes regulated by muscarinic acetylcholine receptors: application of an improved and statistically comprehensive mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res*, 27(10), 2211-2218.
- Wagner, K. U., Boulanger, C. A., Henry, M. D., Sgagias, M., Hennighausen, L., & Smith, G. H. (2002). An adjunct mammary epithelial cell population in parous females: its role in functional adaptation and tissue renewal. *Development*, 129(6), 1377-1386.
- Walgraffe, D., Devaux, S., Lecordier, L., Dierick, J. F., Dieu, M., Van den Abbeele, J., Pays, E., & Vanhamme, L. (2005). Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 139(2), 249-260.
- Wall, E. H., Auchtung-Montgomery, T. L., Dahl, G. E., & McFadden, T. B. (2005). Short communication: Short-day photoperiod during the dry period decreases expression of suppressors of cytokine signaling in mammary gland of dairy cows. *J Dairy Sci*, 88(9), 3145-3148.
- Walters, D. M., & Rouviere, P. E. (2006). High-density sampling differential display of prokaryotic mRNAs with RAP-PCR. *Methods Mol Biol*, 317, 85-97.
- Wang, Z., Orłowski, J., & Shull, G. E. (1993). Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na/H exchanger. *J Biol Chem*, 268(16), 11925-11928.
- Wang H., Xia Z., Wang Y., Li C., & Sun, L. Y. (1997). Recovering and reamplifying of the differentially expressed cDNA bands isolated from mRNA differential display. A modified method. *Mol Biotechnol*, 9(2), 171-173.
- Wang, X., Li, X., & Feuerstein, G. Z. (1998). Use of novel downstream primers for differential display RT-PCR. *Biotechniques*, 24(3), 382-384, 386.
- Wang, X. F., Yu, M. K., Lam, S. Y., Leung, K. M., Jiang, J. L., Leung, P. S., Ko, W. H., Leung, P. Y., Chew, S. B., Liu, C. Q., Tse, C. M., & Chan, H. C. (2003). Expression, immunolocalization, and functional activity of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms in mouse endometrial epithelium. *Biol Reprod*, 68(1), 302-308.
- Wang, J., Pitarque, M., & Ingelman-Sundberg, M. (2006). 3'-UTR polymorphism in the human CYP2A6 gene affects mRNA stability and enzyme expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 340(2), 491-497.
- Wang, D., Bushnell, D. A., Westover, K. D., Kaplan, C. D., & Kornberg, R. D. (2006). Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*, 127(5), 941-954.

- Warrington, J. A., Nair, A., Mahadevappa, M., & Tsyganskaya, M. (2000). Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics*, 2(3), 143-147.
- Weeraratna, A. T. (2003). Serial analysis of gene expression (SAGE): advances, analysis and applications to pigment cell research. *Pigment Cell Res*, 16(3), 183-189.
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G., & Preis, D. (1991). The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur J Biochem*, 197(3), 563-576.
- Welch, C. L., Xia, Y. R., Edwards, P. A., Lusic, A. J., & Ericsson, J. (1998). Assignment of Gpam to distal mouse chromosome 19 by linkage analysis. *Mamm Genome*, 9(1), 93.
- Wesolowski, S. R., Raney, N. E., & Ernst, C. W. (2004). Developmental changes in the fetal pig transcriptome. *Physiol Genomics*, 16(2), 268-274.
- Wiame, I., Remy, S., Swennen, R., & Sagi, L. (2000). Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *Biotechniques*, 29(2), 252-254, 256.
- Wiedmann, R. T., Doumit M. E., Matukumalli, L. K., Sonstegard T. S., Coutinho, L. L., Nonneman, D. & Smithy T. P. L. (2006). Expression profiles of micro-RNAs in swine muscle development. Paper presented at the 30th International Conference on Animal Genetics, Porto Seguro, Belo Horizonte, Brazil: CBRA, 2006. ISBN 85-85584-03-3 (CD); 85-85584-02-5.
- Winston, F. (2001). Control of eukaryotic transcription elongation. *Genome Biol*, 2(2), Reviews 1006.
- Wittlin, S., Sutherland, K. D., Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2003). Identification of Taxreb107 as a lactogenic hormone responsive gene in mammary epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1642(3), 139-147.
- Woodward, W. A., Chen, M. S., Behbod, F., & Rosen, J. M. (2005). On mammary stem cells. *J Cell Sci*, 118(Pt 16), 3585-3594.
- Wray, G. A., Hahn, M. W., Abouheif, E., Balhoff, J. P., Pizer, M., Rockman, M. V., & Romano, L. A. (2003). The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 20(9), 1377-1419.
- Wu, W. X., Zhang, Q., Ma, X. H., Unno, N., & Nathanielsz, P. W. (1999). Suppression subtractive hybridization identified a marked increase in thrombospondin-1 associated with parturition in pregnant sheep myometrium. *Endocrinology*, 140(5), 2364-2371.
- Wurmbach, E., Gonzalez-Maeso, J., Yuen, T., Ebersole, B. J., Mastaitis, J. W., Mobbs, C. V., & Sealfon, S. C. (2002). Validated genomic approach to study differentially expressed genes in complex tissues. *Neurochem Res*, 27(10), 1027-1033.

- Xiao, F., Mirwald, A., Papaioannou, M., Baniahmad, A., & Klug, J. (2005). Secretoglobin 2A1 is under selective androgen control mediated by a peculiar binding site for Sp family transcription factors. *Mol Endocrinol*, 19(12), 2964-2978.
- Xu, H., Collins, J. F., Bai, L., Kiela, P. R., Lynch, R. M., & Ghishan, F. K. (2001). Epidermal growth factor regulation of rat NHE2 gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281(2), C504-513.
- Xu, R., Spencer, V. A., & Bissell, M. J. (2007). Extracellular matrix-regulated gene expression requires cooperation of SWI/SNF and transcription factors. *J Biol Chem*, 282(20), 14992-14999.
- Yamashita, H., Nevalainen, M. T., Xu, J., LeBaron, M. J., Wagner, K. U., Erwin, R. A., Harmon, J. M., Hennighausen, L., Kirken, R. A., & Rui, H. (2001). Role of serine phosphorylation of Stat5a in prolactin-stimulated beta-casein gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, 183(1-2), 151-163.
- Yamauchi, K., Sakamoto, A., Nishiyama, N., & Shimada, N. (2005). Identification of thyroid hormone-responsive genes in a chicken hepatoma cell line, LMH. *Zoolog Sci*, 22(10), 1131-1135.
- Yang, J., Kennelly, J. J., & Baracos, V. E. (2000)a. The activity of transcription factor Stat5 responds to prolactin, growth hormone, and IGF-I in rat and bovine mammary explant culture. *J Anim Sci*, 78(12), 3114-3125.
- Yang, J., Kennelly, J. J., & Baracos, V. E. (2000)b. Physiological levels of Stat5 DNA binding activity and protein in bovine mammary gland. *J Anim Sci*, 78(12), 3126-3134.
- Yang, S., & Liang, P. (2004). Global analysis of gene expression by differential display: a mathematical model. *Mol Biotechnol*, 27(3), 197-208.
- Yang, S., & Liang, P. (2006). Global analysis of gene expression by differential display: a mathematical model. *Methods Mol Biol*, 317, 3-21.
- Yao, Y. C., Tian, L., Han, H. B., Chen, X. H., Lu, M. H., Guo, P. C., Zhang, C. F., Li, N., Lian, Z. X., & Li, W. (2006). Preponderance genotype of BMPR-1B improves the pregnant rate of embryo-transfer in sheep. *Progress in biochemistry and biophysics*, 33(11), 1074-1079.
- Yarus, S., Weaver, T. E., & Rosen, J. M. (1997). The carboxy-terminal domain of human surfactant protein B is not required for secretion in milk of transgenic mice. *Front Biosci*, 2, a1-8.
- Ye, S. Q., Zhang, L. Q., Zheng, F., Virgil, D., & Kwitrovich, P. O. (2000). miniSAGE: gene expression profiling using serial analysis of gene expression from 1 microg total RNA. *Anal Biochem*, 287(1), 144-152.

- Yin, J. L., Shackel, N. A., Zekry, A., McGuinness, P. H., Richards, C., Putten, K. V., McCaughan, G. W., Eris, J. M., & Bishop, G. A. (2001). Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol*, 79(3), 213-221.
- Yoshikawa, Y., Mukai, H., Asada, K., Hino, F., & Kato, I. (1998). Differential display with carboxy-X-rhodamine-labeled primers and the selection of differentially amplified cDNA fragments without cloning. *Anal Biochem*, 256(1), 82-91.
- Yoshimi, M., Miyaishi, O., Nakamura, S., Shirasawa, S., Kamochi, H., Miyatani, S., Ikawa, Y., & Shinomura, T. (2005). Identification of genes preferentially expressed in articular cartilage by suppression subtractive hybridization. *J Med Dent Sci*, 52(4), 203-211.
- Yu, J., Zhang, J. W., Peng, H., & Chen, D. (2004). [Identification and analysis of expressed sequence tags related to K562 cells into erythroid differentiation]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 26(2), 150-154.
- Zakharkin, S. O., Kim, K., Mehta, T., Chen, L., Barnes, S., Scheirer, K. E., Parrish, R. S., Allison, D. B., & Page, G. P. (2005). Sources of variation in Affymetrix microarray experiments. *BMC Bioinformatics*, 6, 214.
- Zaros, L. G., Bricarello, P. A., Pires, A. V., Amarante, A. F. T., & Coutinho, L. L. (2006). Gene expression analysis in cattle resistant and susceptible to gastrointestinal nematode infections by real-time RT-PCR. Paper presented at the 30th International Conference on Animal Genetics, Porto Seguro, Belo Horizonte, Brazil: CBRA, 2006. ISBN 85-85584-03-3 (CD); 85-85584-02-5.
- Zhang, B., Wang, Q., & Pan, X. (2007). MicroRNAs and their regulatory roles in animals and peltrelants. *J Cell Physiol*, 210(2), 279-289.
- Zhang, H., Lee, J. Y., & Tian, B. (2005). Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biol*, 6(12), R100.
- Zhang, H., Zhang, R., & Liang, P. (1996). Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic Acids Res*, 24(12), 2454-2455.
- Zhang, Y., Smith, C. L., Saha, A., Grill, S. W., Mihardja, S., Smith, S. B., Cairns, B. R., Peterson, C. L., & Bustamante, C. (2006). DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC. *Mol Cell*, 24(4), 559-568.
- Zhao, S., Molnar, G., Zhang, J., Zheng, L., Averboukh, L., & Pardee, A. B. (1998). 3'-end cDNA pool suitable for differential display from a small number of cells. *Biotechniques*, 24(5), 842-850, 852.



- Zhao, S., Ooi, S. L., & Pardee, A. B. (1995). New primer strategy improves precision of differential display. *Biotechniques*, 18(5), 842-846, 848, 850.
- Zhong, G. Y., Riov, J., Goren, R., & Holland, D. (2000). Competitive hybridization: theory and application in isolation and quantification of differentially regulated genes. *Anal Biochem*, 282(1), 129-135.
- Zhu, Y., Wang, M., Lin, H., Li, Z., & Luo, J. (2001). Identification of estrogen-responsive genes in chick liver. *Cell Tissue Res*, 305(3), 357-363.
- Zoubiane, G. S., Valentijn, A., Lowe, E. T., Akhtar, N., Bagley, S., Gilmore, A. P., & Streuli, C. H. (2004). A role for the cytoskeleton in prolactin-dependent mammary epithelial cell differentiation. *J Cell Sci*, 117(Pt 2), 271-280.

