

Hibridização de cDNA bovino em *Macroarray* humano

Macroarray: uma importante ferramenta para análise de expressão gênica em bovinos

Fabiane Siqueira

Doutora em Genética do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, SP.
biasiqueira@botmail.com

Erika Cristina Jorge

Doutoranda em Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia, Esalq, Universidade de São Paulo – Piracicaba, SP.
ecjorge@esalq.usp.br

Silvia Edelweiss Crusco dos Santos

Pós-doutoranda em Medicina Veterinária no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal, Universidade Estadual Paulista – Campus de Araçatuba, SP.
silviacruzco@terra.com.br

Gustavo Arbex Avelar

Doutorando em Genética do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, SP.
garbex@botmail.com

Maury Dorta de Souza Júnior

Médico Veterinário, Universidade Estadual Paulista – Campus de Araçatuba, SP.
maurydorta@yaboo.com.br

Cláudio Manoel Rodrigues de Melo

Prof. Assistente Dr. do Departamento de Aqüicultura - AQI, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.
cmrmelo@cca.ufsc.br

Luiz Lehmann Coutinho

Prof. Associado do Departamento de Zootecnia, Laboratório de Biotecnologia Animal, Esalq, Universidade de São Paulo – Piracicaba, SP. Email: llcouthin@carpa.ciagri.usp.br

Catalina Romero Lopes

(Orientadora) Profa. Titular do Departamento de Genética, do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, SP. Email: drcatalina@terra.com.br

José Fernando Garcia

(Co-orientador) Prof. Assistente Dr. do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista – Campus de Araçatuba, SP e Pesquisador na International Atomic Energy Agency – IAEA – Vienna – Austria, j.f.garcia@iaea.org

Introdução

O seqüenciamento completo do genoma de diversos organismos possibilitou o desenvolvimento de uma nova área de pesquisa denominada genômica funcional. O desafio da atualidade é analisar a função dos genes identificados com o seqüenciamento do DNA e compreender como esses genes interagem entre si para determinar uma característica ou função fisiológica específica.

Metodologias inovadoras, como aquelas envolvidas nos arranjos de DNA (*DNA arrays*), foram desenvolvidas para explorar os dados gerados a partir das seqüências de DNA e produzir informações sobre os níveis dinâmicos de expressão gênica de genomas inteiros. Essa técnica faz parte de uma nova classe de biotecnologias que permite o monitoramento dos níveis de expressão de milhares de genes simultaneamente (Laughlin *et al.*, 2002).

Os arranjos de DNA são constituídos por suportes sólidos, comumente vidro ou náilon, aos quais estão fixadas de forma ordenada seqüências completas ou parciais de genes em fita simples de DNA, com ou sem função conhecida (Duggan *et al.*, 1999). A partir do mRNA obtido das células em estudo, são produzidas sondas de cDNA (DNA complementar), via transcrição reversa na presença de um nucleotídeo marcado com elemento radioativo ou fluorescente, permitindo assim sua posterior detecção (Heller *et al.*, 1997; Baldwin *et al.*, 1999).

As sondas de cDNA marcadas são hibridizadas aos arranjos e quanto maior a expressão de um gene em uma determinada condição, maior será a intensidade do sinal derivado da sonda hibridizada na região do arranjo que contém a seqüência deste gene. A seqüência de cada gene é imobilizada no suporte em locais específicos e uniformemente distribuídos denominados de *spots* (Felix, 2002).

Os conjuntos de cDNAs podem ser seqüencialmente hibridizados em um único arranjo, no caso das lâminas de vidro (*microarray*), ou em arranjos separados, no caso das membranas de náilon (*macroarray*). A análise dos padrões diferenciais de expressão gênica é realizada através do cálculo da razão entre os valores dos sinais das distintas hibridizações, que refletem a diferença na quantidade do transcrito (Baldwin *et al.*, 1999). A produção das membranas de náilon ou das lâminas de vidro é feita utilizando sondas escolhidas diretamente de bancos de dados como o *GeneBank*, o *dbEST* e o *Unigene* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ou a partir de dados gerados de bibliotecas específicas de cDNA.

Schena *et al.* (1995), descreveram pela primeira vez a grande capacidade analítica da técnica, monitorando 45 genes de *Arabidopsis* simultaneamente. Desde então, a aplicação da tecnologia de *DNA arrays* vem sendo relatada em vários organismos tais como plantas (Schena, 1996; Felix, 2002), leveduras (De Risi *et al.*, 1997; Schoondermark-Stolk *et al.*, 2002), seres humanos (Bubendorf *et al.*, 1999; Chin *et al.*, 2002) e animais (Moody *et al.*, 2002; Dalbiès-Tran & Mermillod,

2003; Evans *et al.*, 2004).

Entretanto, a contribuição desta técnica para a ciência depende da complexidade e da identidade da biblioteca de cDNA a partir da qual o arranjo é feito. No momento, a coleção de cDNAs humanos é a mais representativa e melhor caracterizada entre todas as espécies de mamíferos, podendo fornecer uma alternativa viável para a identificação de um grande número de genes em espécies domésticas com importância econômica, como bovinos, suínos e caprinos, devido à alta taxa de homologia existente entre as seqüências gênicas dessas espécies (Adjaye *et al.*; Jones *et al.*, 2004).

O uso de arranjos de DNA para estudos de análises de expressão gênica em bovinos ainda é raro, apesar da disponibilidade de aproximadamente 497.315 ESTs de bovinos *Bos primigenius taurus* e 5.950 ESTs de bovinos *Bos primigenius indicus* depositadas no banco de dados do *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html). Uma das razões para o fato de que esta tecnologia não esteja sendo mais amplamente empregada em bovinos é a inexistência de arranjos de DNA bovinos disponíveis comercialmente (Jones *et al.*, 2004), com exceção do *CattleArray 7600™*, que contém mais de 7.000 clones de cDNA de bibliotecas de baço e de placenta impressos em duplicata em uma lâmina de vidro (Pyxis Genomics Inc, Chicago, EUA).

Especificamente na esfera reprodutiva de animais de produção, a análise da expressão gênica pode ser de grande utilidade na busca de genes candidatos responsáveis por fenótipos desejáveis. Como o sucesso reprodutivo é essencial para o desenvolvimento econômico dos rebanhos, muitos estudos têm sido direcionados para essa área, dentre eles a seleção de bovinos da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*) que apresentem características desejáveis quanto à precocidade sexual, comparáveis àquelas apresentadas por animais *Bos primigenius taurus*. A raça Nelore é a principal raça de gado de corte no Brasil, compondo 80% do rebanho nacional, estando distribuída nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste e, predomi-

nantemente no Centro-Oeste e Norte do país (De Lucia, 2002).

Em geral, fêmeas bovinas da raça Nelore atingem a maturidade reprodutiva acima dos 24 meses de idade, enquanto que as fêmeas bovinas das raças que compõem a subespécie *Bos primigenius taurus* atingem essa fase entre 12 e 16 meses de idade. Esta disparidade fenotípica entre as diferentes raças que compõem as duas subespécies gera transtornos no processo produtivo, levando, no caso das fêmeas da subespécie *Bos primigenius indicus*, a atraso de pelo menos um ano na cadeia de produção bovina, quando comparado com o que ocorre nas fêmeas da subespécie *Bos primigenius taurus*.

O desenvolvimento biotecnológico e a aplicação desse conhecimento à pecuária nacional podem trazer novas perspectivas e diminuir o tem-

po de seleção de animais geneticamente superiores.

Devido ao alto grau de conservação das seqüências gênicas entre espécies relacionadas e da importância do conhecimento dos processos fisiológicos que controlam o sistema reprodutivo em bovinos, este trabalho teve como objetivo avaliar o uso de arranjos de náilon contendo cDNA humano em hibridizações heterólogas com cDNAs bovinos, para identificar genes diferencialmente expressos entre folículos dominantes de novilhas da raça Nelore pré-púberes e púberes.

Metodologia

Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas 3 novilhas da raça Nelore com 7 meses de idade (pré-púberes) e 2 novilhas com 25 meses

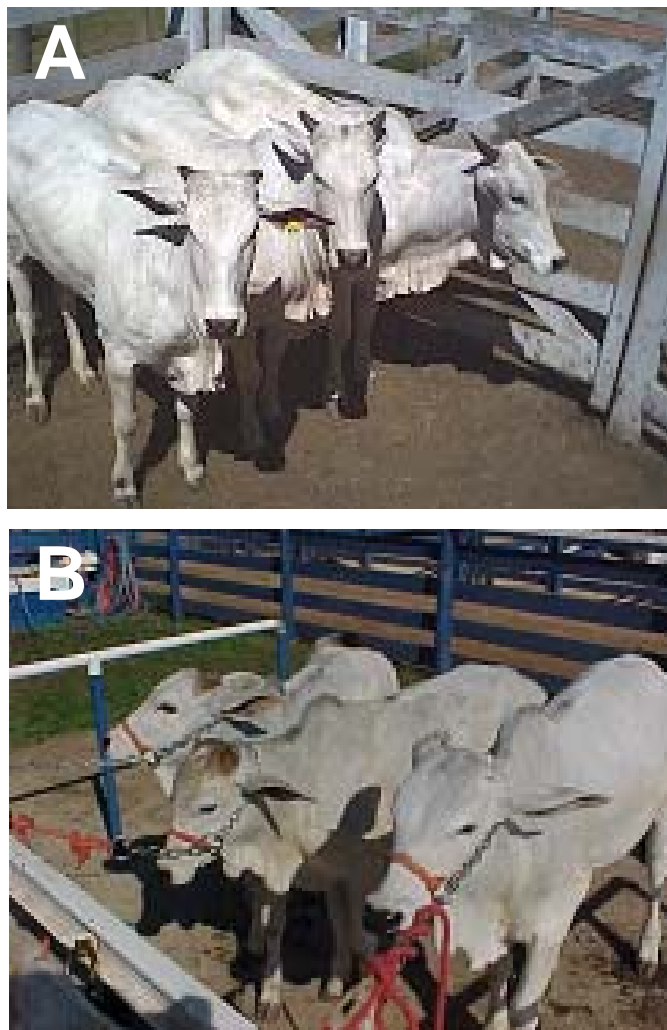


Figura 1: Novilhas da raça Nelore utilizadas nos experimentos. A – Novilhas pré-púberes (Grupo I). B – Novilhas púberes (Grupo II).

Tabela 1: Genes envolvidos com a reprodução mais expressos nas novilhas pré-púberes (Grupo I) e nas novilhas púberes (Grupo II).

	Genes mais expressos no Grupo I		Genes mais expressos no Grupo II	
	Número de genes	Porcentagem (%)	Número de genes	Porcentagem (%)
> 51 vezes	2	4,65	1	2,33
41-50 vezes	4	9,30	0	0,00
31-40 vezes	1	2,33	1	2,33
21-30 vezes	5	11,63	2	4,65
11-20 vezes	4	9,30	4	9,30
2-10 vezes	10	23,25	5	11,62
< 2 vezes	1	2,33	3	6,98
Total	27	62,79	16	37,21

Porcentagens são calculadas como frações do total de 43 genes diferencialmente expressos ($P < 0,01$).

de idade (púberes), provenientes do município de Araçatuba, SP (Figura 1). O acompanhamento da dinâmica folicular foi feito através de exames ultra-sonográficos diários (a partir dos 4 meses de idade para as novilhas pré-púberes e dos 22 meses de idade para as novilhas púberes) utilizando o equipamento de ultra-sonografia GE (General Electric Logic™ α -100 CE 0459; GE Medical System, Milwaukee, EUA) acoplado a um transdutor linear de 5 MHz para uso transretal. Os exames para avaliação dos ovários foram feitos de acordo com metodologia descrita por Ginther *et al.* (1996). As novilhas foram abatidas quando seus folículos dominantes apresentavam o diâmetro máximo de crescimento, determinado arbitrariamente após o acompanhamento das ondas de crescimento folicular, durante 3 meses nos dois grupos experimentais. Imediatamente após o abate, o folículo dominante foi dissecado do ovário e congelado

em nitrogênio líquido.

Extração de RNA total

O RNA total foi extraído dos folículos dominantes pelo método TRizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), conforme o protocolo do fabricante. Em seguida, o RNA foi submetido a tratamento com DNase (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) para garantir a remoção de qualquer resquício de DNA contaminante presente nas amostras. A quantificação do RNA total foi realizada por espectrofotometria a 260nm em equipamento UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 10 (Perkin Elmer, CT, EUA). A qualidade das amostras de RNA foi avaliada em gel de agarose desnaturante de formaldeído a 1% e por meio da análise da razão espectrofotométrica DO_{260}/DO_{280} . O índice DO_{260}/DO_{280} foi considerado adequado para hibridizações heterólogas em membranas de náilon

quando esteve acima de 1,8, indicando tratar-se de boa extração sem a presença de contaminação por proteínas.

Síntese de cDNA marcado radioativamente

Para a síntese do cDNA foram utilizados 10 μ g de um *pool* constituído de quantidades iguais de RNA proveniente de folículos de novilhas pré-púberes e 10 μ g de um *pool* constituído de quantidades iguais de RNA total proveniente de folículos de novilhas púberes. Os cDNAs foram sintetizados através da reação de transcriptase reversa, utilizando-se o sistema SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) com a utilização de oligo dT, na presença de 5 μ L de α -³²P-dCTP (10 mCi/mL; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA).

O cDNA marcado com o isótopo radioativo (sonda) foi purificado atra-

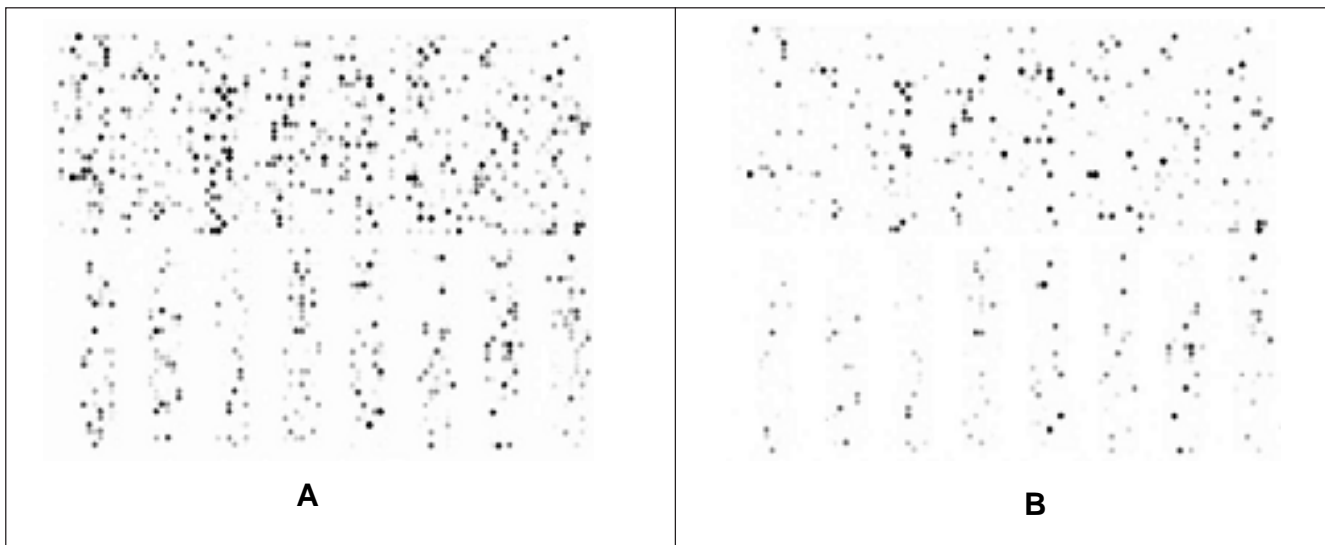


Figura 2: Imagens digitalizadas das membranas de náilon GF211 contendo 5.184 seqüências de genes humanos, submetidas a hibridizações heterólogas utilizando cDNA bovino. A – RNA total de folículo dominante de novilhas pré-púberes. B – RNA total de folículo dominante de novilhas púberes.

vés de passagem por colunas de cromatografia (ProbeQuant™ G50 Micro Columns - Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) para remover os nucleotídeos que não foram incorporados durante a síntese. Em seguida, a sonda foi desnaturada em termociclador (PTC-100™ Programmable Thermal Controller MJ - Research, CA, EUA) a 96°C por 10 minutos e acondicionada em gelo, até o momento de ser adicionada à membrana no processo de hibridização.

Hibridização e aquisição das imagens

Para as hibridizações foram utilizadas duas membranas *Human Named Genes* - GF211 (Research Genetics - Invitrogen Life Technologies, Huntsville, AL, USA), que contém 5.184 seqüências de genes humanos com função conhecida. Uma membrana foi utilizada para hibridizar o cDNA sintetizado a partir do RNA total dos folículos das novilhas pré-púberes e a outra para o cDNA originado a partir do RNA total dos folículos das novilhas púberes.

Cada ponto da membrana contém aproximadamente 0,5 ng de inserto de DNA de um clone contendo a terminação 3' do transcrito. Os clones de cDNA foram selecionados da coleção do *Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression* (IMAGE Consortium, LLNL).

As membranas foram inicialmente lavadas em solução previamente

aquecida a 100°C de dodecil sulfato de sódio 0,5% (SDS) por 10 minutos e pré-hibridizadas em forno de hibridização (Isotemp Hybridization Incubator, Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA) em 5 mL de solução MicroHyb (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) contendo 5 µg (1 µg/µL) dos agentes bloqueadores PolydA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e Cot-1 DNA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), incubando-se por 2 horas a 42°C. Em seguida, a sonda desnaturada foi adicionada a esta solução e as membranas foram hibridizadas em garrafas distintas por aproximadamente 16 horas a 42°C. Após a hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes por 20 minutos a 50°C em 30 mL de solução 2 X SSC/1% SDS e uma vez por 15 minutos a 55°C em 30 mL de solução 0,5 X SSC/1% SDS. Após as lavagens, as membranas foram embaladas individualmente em filme plástico (Brand plastic film - Johnson, EUA), expostas por 24 horas a um écran intensificador (Imaging Plate, Fuji Film, Japan) e digitalizadas a 50 µm de resolução em equipamento *Phosphor Imager Storm 860 Molecular Dynamics* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA).

Análises

As imagens foram analisadas com o auxílio do software *ArrayVision™* 8.0 (Imaging Research Inc, Ontario,

Canada). O programa gerou tabelas de dados com informações referentes à hibridização de cada ponto (região da membrana contendo um único gene). Cada gene recebeu um valor numérico de acordo com a sua respectiva intensidade na imagem. Após a quantificação dos sinais, o *background* (emissão de fundo presente em toda membrana) foi subtraído do valor referente a cada ponto. Em seguida, os dados foram normalizados dividindo-se a intensidade de sinal de cada ponto pela mediana do sinal de todos os pontos na membrana (Richmond & Somerville, 2000). Os valores de intensidade dos genes expressos nos folículos das novilhas pré-púberes (Grupo I) foram comparados com os valores de intensidade dos genes expressos nos folículos das novilhas púberes (Grupo II) utilizando o teste t ($P < 0,01$).

Resultados e discussão

Devido ao fato da reprodução ser um evento controlado por múltiplos genes e da possibilidade de analisar simultaneamente os perfis de expressão desses genes em distintos momentos fisiológicos, a técnica de arranjos de DNA, utilizando hibridização heteróloga (bovino x humano), foi aplicada com o intuito de avaliar a expressão gênica diferencial em folículos de novilhas da raça Nelore antes e após o estabelecimento da

puberdade.

Para analisar alterações na expressão gênica em folículos dominantes de novilhas pré-púberes (Grupo I) e púberes (Grupo II), membranas de náilon contendo 5.184 seqüências de genes humanos foram hibridizadas com cDNAs provenientes de RNA total de folículos dominantes desses animais. Exemplos de imagens geradas pela hibridização heteróloga são apresentados na Figura 2.

Condições extrínsecas de hibridização e de lavagens foram mantidas conforme as especificações do fabricante da membrana (Research Genetics - Invitrogen Life Technologies, Huntsville, AL, USA) sugeridas para hibridização homóloga, com o objetivo de preservar a confiabilidade dos resultados e de manter um baixo sinal de *background* na membrana. Segundo Schoondermark-Stolk *et al.* (2002), as membranas GF100 (Research Genetics) contendo 3072 seqüências de genes de *Saccharomyces cerevisiae*, quando utilizadas para hibridizações heterólogas com cDNA de outra levedura (*Zygosaccharomyces rouxii*), apresentaram resultados não confiáveis e mostraram afinidades de ligação não-específica quando as temperaturas de hibridização, das lavagens ou a combinação de ambas foram diminuídas.

A análise dos padrões diferenciais de expressão gênica foi realizada através do cálculo da razão dividindo-se a média de intensidade dos genes das novilhas pré-púberes pela média de intensidade dos genes das novilhas púberes. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando apresentaram valores de razão acima de 1,5 ($P < 0,01$).

Dos 5.184 genes presentes na membrana *Human Named Genes GF211* (utilizada no presente estudo), 526 genes (10,14%) foram considerados diferencialmente expressos utilizando o teste t ($P < 0,01$), sendo que destes 404 (7,79%) foram mais expressos nas novilhas pré-púberes e 122 (2,35%) foram mais expressos nas novilhas púberes. Dos 526 genes diferencialmente expressos, 43 genes (8,17%) estão envolvidos com reprodução, entre eles estão presentes alguns hormônios, como hormônio

liberador de gonadotrofinas (GNRH) que estimula a liberação de FSH e LH, o receptor de leptina (LEPR) que está envolvido na regulação do metabolismo de gordura e possivelmente na reprodução, o receptor de ocitocina (OXTR) que facilita o transporte de gametas, induz contrações uterinas e induz a descida do leite, e o receptor de hormônio esteróide (ESRRA) que está relacionado ao receptor de estrógenos.

Alguns genes relacionados a fatores de crescimento também apresentaram expressão diferencial, como, por exemplo, a proteína ligadora do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP5) que regula a proliferação e a diferenciação de vários tipos celulares, o fator de crescimento de transformação (TGFBI) que está intimamente relacionado ao fator de crescimento epidérmico sendo produzido nas células da granulosa, da teca e no oócito, e o receptor para ativina A (ACVR2) que está associado à liberação de FSH. Os fatores de crescimento são substâncias relacionadas aos hormônios e controlam o crescimento e o desenvolvimento de diversos órgãos, tecidos e células em cultivo. Além dos hormônios das glândulas endócrinas, inúmeras pesquisas revelaram o papel de fatores de crescimento peptídicos em reprodução durante a última década (Hafez & Hafez, 2004). A Tabela 1 apresenta o número de genes mais expressos nas novilhas pré-púberes e púberes e as porcentagens referentes aos 43 genes diferencialmente expressos envolvidos com reprodução.

Cada experimento de hibridização foi realizado em duplicata com o objetivo de verificar a repetibilidade da técnica e de aumentar a confiabilidade dos dados. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre duas membranas hibridizadas em momentos diferentes com cDNA sintetizado a partir do mesmo RNA. O coeficiente de correlação (r) é uma medida da intensidade de associação existente entre duas variáveis quantitativas (Callegari-Jacques, 2003). Os valores obtidos para o coeficiente de correlação foram 0,98 e 0,99 para os folículos das novilhas pré-púberes e púberes, respectivamente. Estes resultados indicam que a reprodutibilidade da téc-

nica foi alta para as hibridizações entre os dois grupos de animais. Moody *et al.* (2002) utilizando a mesma membrana (GF211) analisaram hibridizações heterólogas entre cDNA de suíno e de humano e, por meio do cálculo de coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman, obtiveram valores de 0,96 (Pearson) e 0,97 (Spearman) entre as hibridizações com cDNA suíno em membranas contendo genes de humanos e 0,97 para ambos coeficientes entre hibridizações com cDNA de humano nas mesmas membranas.

A análise comparativa entre as seqüências de genes humanos que estão presentes na membrana com as seqüências de genes bovinos que estão depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) revelou um índice médio de homologia de 90%, indicando que esta alta homologia permite o uso de hibridizações heterólogas para avaliar expressão gênica em folículos dominantes de novilhas da raça Nelore. Segundo Schoondermark-Stolk *et al.* (2002), o índice de homologia utilizado para a detecção de genes diferencialmente expressos em hibridizações heterólogas deve estar acima de 83%.

Conclusão

Trata-se do primeiro trabalho completamente realizado no Brasil envolvendo o uso de *macroarrays* para o estudo de fenômenos fisiológicos em animais de produção. A metodologia para a hibridização heteróloga (bovino x humano) utilizando arranjos de DNA mostrou-se eficiente para o estudo de expressão gênica em bovinos, gerando grande quantidade de informações que deverão ser avaliadas cuidadosamente nas próximas etapas, durante as quais serão validados, utilizando a técnica de *Real-time Quantitative PCR* (Q-RT-PCR), alguns dos genes que apresentaram expressão diferencial. Estes resultados poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da maturidade sexual em fêmeas bovinas, contribuindo para o conhecimento dos processos fisiológicos que modulam as atividades reprodutivas.

Espera-se que as informações pre-

liminares obtidas neste trabalho sinalizem novos genes candidatos a marcadores moleculares relacionados à precocidade sexual em bovinos da raça Nelore.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro concedido a este projeto (Projetos FAPESP N° 97/13372-9 e 00/07772-9 e Projetos CNPq N° 464357/2000-4 e N° 301432/03-1). Nossos agradecimentos a Fazenda Santa Cecília - OMF - Araçatuba, pelo fornecimento dos animais.

Referências bibliográficas

- ADJAYE, J.; HERWIG, R.; HERRMANN, D. et al. Cross-species hybridisation of human and bovine orthologous genes on high density cDNA microarrays. **BMC Genomics**, v.5, n.83, 2004.
- BALDWIN, D.; CRANE, V. & RICE, D. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.96-103, 1999.
- BUBENDORF, L.; KOLMER, M.; KONONEN, J. et al. Hormone therapy in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. **Journal of the National Cancer Institute**, v.91, n.20, p.1758-1764, 1999.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística princípios e aplicações**. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255p.
- CHIN, K. V.; SEIFER, D. B.; FENG, B.; LIN, Y. & SHIH, W. C. DNA microarray analysis of the expression profiles of luteinized granulosa cells as a function of ovarian reserve. **Fertility and Sterility**, v.77, n.6, p.1214-1218, 2002.
- DALBIÈS-TRAN, R. & MERMILLOD, P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. *Biology of Reproduction*, v.68, p.252-261, 2003.
- DE LUCIA, R. F. S. **Avaliação e caracterização da fisiologia ovariana e da fertilidade de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) de linhagem precoce**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2002.
- DE RISI, J.; VISHWANATH, R.L.; BROW, P.D. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression in a genomic scale. **Science**, v.278, p.680-686, 1997.
- DUGGAN, D. J., BITTNER, M., YI-DONG, C., MELTZER, P. & TRENT, J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. **Supplement to Nature Genetics**, v. 21, p.10-14, 1999.
- EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. L. H.; WINN, M. E.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; COUSSENS, P. M. & IRELAND, J. J. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. **In Press in Biology of Reproduction**, 2004.
- FELIX, J. M. Perfil da expressão gênica em raízes de milho expostas ao alumínio utilizando *macroarrays*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p.1187-1194, 1996.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.
- HELLER, R. A.; SCHENA, M.; CHAI, A.; SHALON, D.; BEDILION, T.; GILMORE, J.; WOOLLEY, D. E. & DAVIS, R. W. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. **Biochemistry**, v.94, p.2150-2155, 1997.
- JONES, K. L.; KING, S. S. & IQBAL, M. J. Endophyte-infected tall fescue diet alters gene expression in heifer luteal tissue as revealed by interspecies microarray analysis. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, p.154-161, 2004.
- LAUGHLIN, A. M.; FORREST, D. W.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. C.; WELSH JR., T. H.; JOHNSON, L. & ING, N. H. DNA Microarray analysis of gene expression in testicular tissue of stallions. **Theriogenology**, v.58, p.413-415, 2002.
- MOODY, D.; ZOU, Z. & MCINTYRE, L. Cross-species hybridization of pig RNA to human nylon microarrays. **BMC Genomics**, v.3, n.27, p. 1-11, 2002.
- RICHMOND, T. & SOMERVILLE, S. Chasing the dream: plant EST microarrays. **Current opinion in plant Biology**, v.3, p.108-116, 2000.
- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W. & BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v.270, p.467-470, 1995.
- SCHENA, M.; Genome Analysis with gene expression Microarrays. **Bioassays**, v.18, p.427-431, 1996.
- SCHOONDERMARK-STOLK, S.A.; SCHURE, E. G.; VERRIPS, T.; VERKLEIJ, A. J. & BOONSTRA, J. Identification of salt-induced genes of *Zygosaccharomyces rouxii* by using *Saccharomyces cerevisiae* GeneFilters[®]. **FEMS Yest Research**, v.2, p.525-532, 2002.