



ISSN 1676-7659

Agosto, 2008

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

Documentos 78

On line

A Biologia Avançada e o Impacto da Genômica na Produção de Caprinos e Ovinos

*Lúcia Helena Sider
Lilian Giotto Zaros*

Embrapa Caprinos e Ovinos
Sobral, CE
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04

Caixa Postal: 145

CEP:62010-970

Fone: (0xx88) 3112-7400

Fax: (0xx88) 3112-7455

Home page: www.cnpc.embrapa.br

E-mail (sac): www.cnpc.embrapa.br/sac.htm

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Lúcia Helena Sider

Secretário-Executivo: Diônes Oliveira Santos

Membros: Alexandre César Silva Marinho, Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campêlo, Verônica Maria Vasconcelos Freire, Fernando Henrique M. A. R. Albuquerque, Jorge Luís de Sales Farias, Mônica Matoso Campanha e Leandro Silva Oliveira.

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho

Revisão gramatical: Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campêlo

Editoração eletrônica: Alexandre César Silva Marinho

1ª edição on line

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Caprinos e Ovinos

Sider, Lúcia Helena.

A biologia avançada e o impacto da genômica na produção de caprinos e ovinos / Lúcia Helena Sider, Lilian Giotto Zaros. – Sobral : Embrapa Caprinos e Ovinos, 2008.

47 p. : color. - (Documentos / Embrapa Caprinos e Ovinos, ISSN1676-7659 ; 78).

1. Genética animal. 2. Genoma. I. Zaros, Lilian Giotto. II. Embrapa Caprinos e Ovinos. III. Título. IV. Série.

CDD 636.30821

© Embrapa 2008

Autores

Lúcia Helena Sider

Méd. Vet., D. Sc. em Reprodução Animal
Embrapa Caprinos e Ovinos
Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal 145
CEP: 62010-970 - Sobral/CE
Fone: (0xx88) 3112-7400
Fax: (0xx88) 3112-7455
E-mail: sider@cnpq.embrapa.br

Lilian Giotto Zaros

Bióloga, D. Sc. em Ciência Animal e Pastagens
Embrapa Caprinos e Ovinos
E-mail: lilian@cnpq.embrapa.br

Apresentação

A era genômica teve início na década de 90, com o advento dos primeiros sequenciamentos completos de genomas de microorganismos (*Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalium*, em 1995). Não demorou muito para o sequenciamento de genomas de organismos mais complexos, como algumas plantas, animais e até mesmo o do ser humano, concluído em 2001.

A produção de ruminantes vivencia cada vez mais os avanços da Genômica. Algumas espécies já possuem o seu genoma sequenciado completamente, como a espécie bovina, em 2004; outras contam com projetos em andamento. Este é o caso do genoma ovino e será o caso, em pouco tempo, do genoma caprino, que já conta com uma proposta que, embora não seja um projeto genoma formal, caminha neste sentido (Projeto BioBode). A importância destes projetos não é apenas em conhecer sequências gênicas, informação aparentemente sem relevância, mas sobretudo nas análises funcionais destes genes, ajudando a elucidar, junto com a genética e a fisiologia, o papel de cada um e suas inter-relações.

A tecnologia genômica, bem como outras tecnologias do DNA recombinante, geraram mudanças qualitativas e quantitativas no desenvolvimento das biotécnicas e proporcionaram ao homem o controle e a manipulação do genoma animal, otimizando seu potencial e consequentemente tornando sua produção mais rentável.

A Genômica trouxe consigo a Bioinformática que analisa também as informações geradas pela Proteômica. Estas três áreas básicas contribuem, por sua vez, para os estudos de Caracterização e Conservação de Recursos Genéticos, Melhoramento Genético Animal e seus desdobramentos, como a Transformação Genética (Transgenia). Todas estas fazem parte de uma área recentemente denominada Biologia Avançada, que será apresentada ao longo deste documento. A Biologia Avançada Animal conta ainda com a interação com outras ferramentas da biologia, sobretudo a Tecnologia do DNA recombinante e a Biotecnologia da Reprodução.

Este documento procura esclarecer o papel da Genômica e de outras áreas afins, dentro da Biologia Avançada tendo sempre em vista o foco na produção de pequenos ruminantes.

Maria Pinheiro Fernandes Corrêa

Chefe-Geral

Embrapa Caprinos e Ovinos

Sumário

Introdução	09
Biologia Avançada na Produção de Pequenos Ruminantes	11
Projetos Envolvendo Diversas Subáreas da Biologia Avançada na Produção de Pequenos Ruminantes	38
Considerações Finais.....	39
Referências Bibliográficas	40

A Biologia Avançada e o Impacto da Genômica na Produção de Caprinos e Ovinos

Lúcia Helena Sider

Lilian Giotto Zaros

Introdução

A Biologia Avançada é uma recente área do conhecimento que engloba uma série de tecnologias modernas e, sobretudo, ferramentas que podem ser aplicadas em qualquer ramo da Biologia, da Medicina e da Agropecuária.

A produção de pequenos ruminantes também já começou a se beneficiar destas ferramentas. Alguns progressos já são evidentes, principalmente na espécie ovina. No entanto, há ainda muito o que ser feito, fato que fica evidenciado quando se comparam os avanços da biologia avançada em pequenos ruminantes a aqueles já alcançados na espécie humana, em outros organismos-modelo, como o camundongo, e mesmo em bovinos, espécie ruminante de maior interesse no setor produtivo até o momento.

A Genômica figura entre uma das mais importantes sub-áreas da Biologia Avançada, e seu impacto tem crescido nos últimos anos, inclusive no Brasil, que entrou na era genômica no final da década de 90, com o seqüenciamento completo do primeiro fitopatógeno, a *Xylella fastidiosa*, microrganismo causador da clorose variegada dos citros (CVC), popularmente conhecida como amarelinho (SIMPSON et al., 2000). Depois disso, pelo fato de o Brasil movimentar uma grande parcela de sua economia em

produtos agrícolas, foi colocado grande interesse na elucidação de outros genomas de patógenos de culturas de interesse nacional como cana-de-açúcar, citros e outros (CARRARO; KITAJIMA, 2002). Dessa forma, outras bactérias tiveram seus genomas seqüenciados completamente por grupos de cientistas brasileiros, como diferentes cepas de *Xanthomonas citri*, bactéria causadora do cancro cítrico (SILVA et al., 2002), outras cepas de *Xylella fastidiosa* que infectam especificamente outras culturas e *Leifsonia xyli xyli*, causadora do carvão da cana-de-açúcar. Em seguida, seguiram-se o genoma câncer humano, também com grande impacto no cenário mundial e outros projetos genoma, tais como o do café, eucalipto, bovino, entre outros.

Se no primeiro momento foram concluídas as etapas de seqüenciamento extensivo, seguem-se agora os estudos funcionais que, como o nome indica, procuram elucidar as funções de cada gene seqüenciado, bem como sua interação com outros genes do organismo. Estes genes podem ser identificados por porções de 200 a 400 pares de bases seqüenciadas denominadas etiquetas de seqüências expressas (“ESTs”, do inglês “Expressed Sequence Tags”) (ADAMS et al., 1991), depositadas em bancos de dados, como o GenBank (NCBI, 2008), e disponíveis para a comunidade científica. A Tabela 1 mostra a comparação do número de ESTs entre a espécie humana e as principais espécies de ruminantes, além de indicar se a espécie teve seu genoma seqüenciado por completo ou não.

Tabela 1 - Quantitativo de informação genética: número de ESTs depositadas no GenBank provenientes de humanos e das principais espécies de ruminantes.

Espécie	ESTs	Genoma Completo
Homo sapiens	8.254.894	SIM
<i>Bos taurus</i>	1.560.234	SIM
<i>(Bos indicus)</i>	(35.759)	
<i>Ovis aries</i>	210.025	em andamento
<i>Capra hircus</i>	13.518	NÃO

Fonte: NCBI (2008).

A Tabela 1 evidencia a defasagem das pesquisas em genética nos pequenos ruminantes, principalmente na espécie caprina, em relação às espécies mais estudadas. As espécies humana e bovina, já com os seus genomas seqüenciados, chegaram a um número razoavelmente estável de ESTs depositadas, embora continuem aumentando lentamente. Diferentemente, as espécies de pequenos ruminantes tendem a aumentar ainda mais a quantidade de ESTs depositadas significativamente, sobretudo a espécie ovina, em função do projeto genoma ovino, em andamento, que é um consórcio mundial que tem a participação brasileira da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Na espécie caprina, as pesquisas em genética ainda são muito recentes e ainda não há um Projeto Genoma propriamente dito. No entanto, já existe uma iniciativa de entidades nordestinas, incluindo a Embrapa Caprinos e Ovinos, no sentido de seqüenciar e caracterizar ESTs e proteínas provenientes de diferentes tecidos de interesse de diversas espécies caprinas (Projeto BioBode). Estes projetos serão novamente abordados mais adiante.

Nesse contexto, o objetivo deste documento é mostrar o que já foi ou tem sido desenvolvido na área de Biologia Avançada, sobretudo na genômica e sua influência nas demais sub-áreas, em relação à produção de pequenos ruminantes, bem como o enorme potencial de pesquisa utilizando estas espécies. No final do documento, são apresentados alguns projetos de pesquisa em rede que envolvem várias destas sub-áreas em prol de um objetivo comum.

Biologia Avançada na Produção de Pequenos Ruminantes

Para efeitos didáticos, podemos dividir a Biologia Avançada na produção de pequenos ruminantes nas seguintes subáreas:

- Genômica estrutural e funcional.
- Proteômica.

- Bioinformática.
- Anotação de genomas.
- Estudos de biodiversidade (caracterização e conservação de recursos genéticos).
- Bioprospecção.
- Prospecção de genes.
- Melhoramento Genético (seleção assistida por marcadores).
- Transformação genética (Transgenia).
- Biossegurança.

Esta subdivisão é útil, no entanto não implica que o limite de cada uma destas subáreas seja intransponível. De fato, o que ocorre é uma inter-relação muito intensa entre elas, de modo que muitas vezes fica difícil dizer onde uma começa ou termina (Fig. 1).

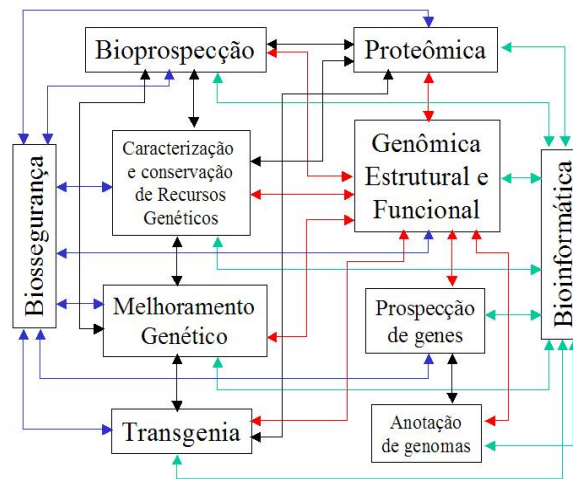


Fig. 1. Inter-relação entre as diferentes subáreas da Biologia Avançada.

Genômica Estrutural e Funcional

A Genômica é uma área que despontou nos anos 90 com o seqüenciamento, ainda em forma manual, do genoma de um bacteriófago. Em seguida, com o advento dos seqüenciadores automáticos, foram seqüenciados o genoma das bactérias *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma genitalum*, por equipes lideradas por J. Craig Venter. O trabalho, que antes era complexo e demorado, tornou-se mais fácil e ágil, possibilitando o seqüenciamento de até mesmo organismos superiores, como a espécie humana, que teve a conclusão de seu genoma anunciado em 2001 (VENTER et al., 2001).

A Genômica, desde então, vem causando um grande impacto em várias outras áreas do conhecimento, uma vez que promete desvendar a estrutura e função de cada gene constituinte de um organismo. O Brasil vem acompanhando os avanços de perto e já se tornou uma referência mundial por ter sido o primeiro país a seqüenciar o genoma completo de um fitopatógeno (*Xylella fastidiosa*) e por participar de outros projetos de repercussão mundial (genoma humano do câncer, genoma bovino, etc.).

A Genômica se divide em duas grandes áreas: a genômica estrutural e a funcional. A genômica estrutural, como o nome indica, estuda a estrutura dos genes. Suas abordagens vão desde as ferramentas de mapeamento genético, passando pelo seqüenciamento em larga escala de genes e incluindo a análise estrutural e modelagem de proteínas (Proteômica). Sua principal meta é a geração de dados (seqüências gênicas e suas respectivas localizações no cromossomo). Por outro lado, a genômica funcional tem como meta o estudo da função destes genes. Sua principal ferramenta é o estudo da expressão gênica diferencial de transcritos de RNA mensageiro (comparação de transcriptomas) entre perfis fisiológicos ou patológicos, desafios farmacológicos ou até mesmo raças ou espécies distintas. A proteômica também estuda a expressão gênica, mas em nível de tradução (perfil de expressão protéica ou proteoma).

Cabe neste momento detalhar os conceitos de genoma, transcriptoma e proteoma. Entende-se por genoma o conjunto gênico de um organismo, incluindo os genes propriamente ditos, as seqüências regulatórias e as

demais seqüências de DNA de um organismo. O genoma tem como característica o fato de ser igual, a princípio, para todas as diferentes células do organismo. Transcriptoma é o conjunto de seqüências transcritas ou RNAm. Diferentemente do genoma, o transcriptoma é característico para cada tipo celular, uma vez que o repertório de genes expressos por um dado tecido difere significativamente de outros tecidos. Além disso, o transcriptoma pode diferir em função de diferentes situações fisiológicas ou patológicas, bem como desafios farmacológicos distintos.

Proteoma é a denominação que se dá ao conjunto de proteínas expressas de um tecido. O proteoma guarda muitas semelhanças com o transcriptoma, sobretudo no que tange à sua variação em função de diferentes tecidos ou situações (Tabela 2).

Tabela 2. Dogma central da Biologia Molecular e as características de genoma, transcriptoma e proteoma.

Tipo de molécula	O que o conjunto de moléculas gera	Característica Peculiar
DNA	Genoma	Conteúdo igual para todos os tipos de celulares de um organismo
↓↑		
RNA	Transcriptoma	Perfil diferenciado de acordo com o tipo celular de um organismo
↓		
Proteína	Proteoma	Perfil diferenciado de acordo com o tipo celular de um organismo

Genômica Estrutural

Mapeamento Gênico

Dividido classicamente em mapeamento genético, citológico e físico. Os mapas genéticos são ferramentas já bastante antigas, que datam do início do século passado, que mostram a ordem dos genes em um cromossomo, e são construídos a partir das freqüências de recombinação entre diferentes genes. Os mapas citológicos se seguiram a estes e são baseados em

padrões de bandeamento dos cromossomos, obtidos através da utilização de diferentes corantes seguida da visualização em microscopia óptica. Já os mapas físicos, mais recentes, são baseados em distâncias moleculares, medidas em pares de bases. Estes três tipos de mapas se relacionam entre si, embora não de uma maneira exata. Isto ocorre principalmente porque as freqüências de recombinação não produzem mapas genéticos exatamente proporcionais (SNUSTAD; SIMMONS, 2000).

Recentemente, os mapas de ligação (*linkage maps*) também têm assumido grande importância nos estudos de genômica e genética molecular. Eles permitem estudar a arquitetura genética de características quantitativas, ou seja, identificar, mapear e medir a magnitude do efeito dos principais fatores genéticos envolvidos no controle dessas características (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A base genética para a construção de um mapa de ligação é a recombinação resultante do “crossing over” entre cromossomos homólogos durante a meiose. A recombinação entre diferentes locos é associada com a distância física entre eles. É esperado que dois locos muito distantes num cromossomo tenham maiores chances de se recombinarem. A fração de recombinação não é aditiva ao longo do cromossomo, mas a aditividade aumenta com a distância entre locos. Esta inferência é o fundamento do mapeamento genético. Entretanto, a relação entre recombinação e distância física varia de organismo para organismo (LIU, 1998).

A construção de um mapa de ligação envolve a criação de uma população segregante a partir de duas linhagens progenitoras, identificação dos genótipos de vários marcadores polimórficos no genoma e a utilização de diversas metodologias de análise estatística e computacional para estimar ligação e distancia entre os marcadores (NONES, 2004).

Os marcadores polimórficos, como os “RFLPs”, do inglês “restriction fragment length polymorphisms”), os microssatélites, os “VNTRs” (“variable number of tandem repeats”, os “STRPs” (“short tandem repeats polymorphisms”) e os “SNPs” (“single nucleotide polymorphisms”), podem eventualmente se encontrar próximos a genes de

interesse (em ligação), facilitando os estudos de associação entre tal gene e uma característica fenotípica de interesse. Já existem mapas de ligação descritos tanto para ovinos (MADDOX et al., 2001; GALLOWAY et al., 1996; CRAWFORD et al., 1995) quanto para caprinos (VAIMAN et al., 1996).

Outras ferramentas importantes da genômica estrutural são as bibliotecas "BAC", do inglês "bacterial artificial chromosome". Estes cromossomos artificiais de origem bacteriana podem albergar pedaços de cromossomos de organismos superiores de tamanhos razoáveis, usualmente 150Kb, numa faixa que vai de 100Kb a 350Kb, facilitando o estudo destes, uma vez que a análise de cromossomos inteiros é muito difícil, senão inviável. Estas bibliotecas também já estão disponíveis para ovinos (TABET-AOUL et al., 2000) e caprinos (SCHIBLER et al., 1998).

Estas e outras ferramentas da genômica são bastante úteis para estudos conduzidos na espécie em que foram descritas, mas também podem ser extrapoladas para outras espécies próximas ou mesmo mais distantes, caracterizando os estudos de genômica comparativa. Em espécies onde a informação genética é escassa e, portanto, poucas ferramentas são disponíveis, como os pequenos ruminantes, a genômica comparativa é bastante utilizada.

Seqüenciamento

Uma das primeiras decisões que devem ser tomadas, quando se idealiza um projeto genoma, é a abordagem a ser utilizada. Dois caminhos podem ser seguidos. Um deles é o seqüenciamento de bibliotecas genômicas, também conhecido como estratégia de shot-gun. O outro é o seqüenciamento de bibliotecas de cDNA. A diferença básica entre estas duas abordagens é que, no seqüenciamento das bibliotecas genômicas, o DNA do organismo é seqüenciado por inteiro, o que inclui tanto as regiões codificantes (genes) como as não codificantes. Para alcançar este objetivo, o DNA é fracionado em pedaços menores e subclonado em vetores apropriados que então são introduzidos em bactérias (*E. coli*) que vão multiplicá-los. A utilização de diferentes vetores depende do tamanho do

fragmento a ser clonado: Os plasmídeos aceitam fragmentos de 0 a 10 Kb, assim como os bacteriófagos λ ; cosmídeos, de 30 a 45 Kb; bacteriófago P1, de 70 a 100 Kb; cromossomo artificial de bactéria BAC, até 350 Kb e cromossomo artificial de levedura YAC, de 0,2 a 2Mb. Após a amplificação *in vivo*, o DNA é extraído e seqüenciado. O Esquema 2 ilustra cada uma destas etapas.

Diferentemente, no seqüenciamento das bibliotecas de cDNA, são seqüenciadas apenas as regiões codificantes (os genes propriamente ditos). Neste caso, o RNA mensageiro (RNAm), intermediário entre a informação gênica (DNA) e as proteínas, é convertido em uma molécula mais estável, o cDNA, que é então subclonado e multiplicado em *E. coli* (Fig. 2).

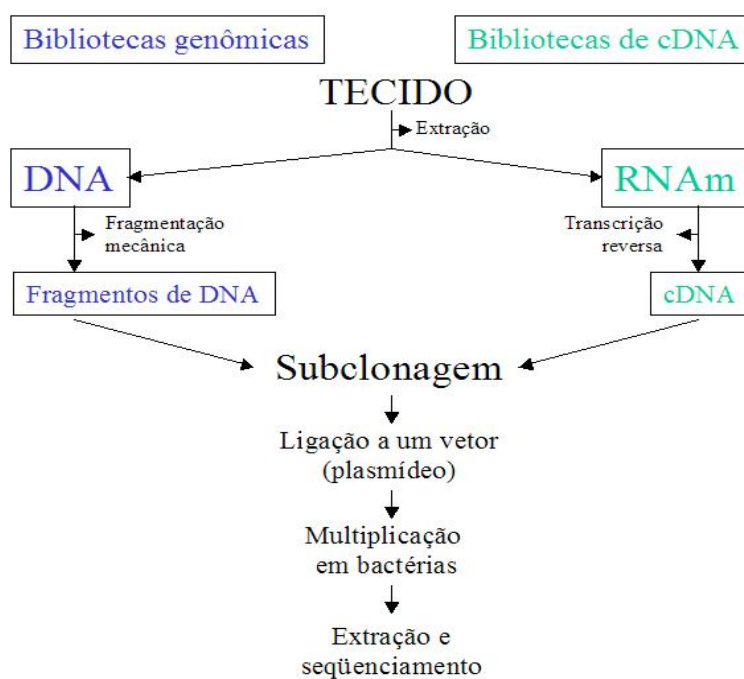


Fig. 2. Diferenças e passos em comum das abordagens iniciais para o seqüenciamento gênico.

O seqüenciamento consiste em determinar a ordem dos nucleotídeos de um fragmento de DNA e pode ser manual ou automático.

O método manual contém duas variações: A primeira foi desenvolvida em meados dos anos 70, por Maxam e Gilbert (1977), e recebeu o nome de seqüenciamento químico ou degradação química. Para a realização dessa técnica, o DNA alvo é marcado com o composto radioativo fósforo 32 (P_{32}) em uma de suas extremidades (5' ou 3'). Após a marcação, os fragmentos de DNA são divididos em 4 tubos, onde cada um deles recebe um tipo de tratamento químico, que causará uma clivagem específica em G, C, G + A e T + C. Se os fragmentos não fossem separados em tubos diferentes, a discriminação de cada nucleotídeo e posterior seqüenciamento, ocorreriam de maneira incorreta. Após a clivagem, os fragmentos são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, e separados de acordo com o seu tamanho. A visualização é feita em radiografia, onde, com o auxílio de uma régua, faz-se a leitura da seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA (FARAH, 2007).

A segunda técnica de seqüenciamento manual foi desenvolvida por Sanger (1975), sendo conhecido como seqüenciamento enzimático ou método dideoxynucleotídeos ou terminação da cadeia. Esse método é baseado na capacidade da enzima DNA polimerase estender a cadeia polinucleotídica a partir de um iniciador ancorado por complementaridade em uma das fitas (fita molde). O DNA alvo também é marcado com fósforo 32 (P_{32}) radioativo e distribuído em 4 novos tubos. Cada tubo contém um nucleotídeo modificado (dideoxynucleotídeo – ddNTP) ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP. Esses nucleotídeos são quimicamente diferentes dos nucleotídeos normais (dNTP), pelo fato de não possuírem um grupamento hidroxila OH no carbono 3' da pentose. Como as fitas de DNA são complementares, a partir do molde, a enzima vai adicionando o nucleotídeo complementar (desoxynucleotídeo- dNTP), até a inserção de um nucleotídeo modificado (ddNTP), que interrompe a extensão da cadeia. Isso é repetido em vários ciclos, originando fragmentos de tamanhos diferentes, marcados com cada nucleotídeo separadamente. Em seguida, os produtos da reação de seqüenciamento são ordenados em gel de poliacrilamida e posteriormente lidos para a determinação da seqüência de nucleotídeos (FARAH, 2007).

O método de seqüenciamento automático utiliza o princípio básico do método de Sanger. Em seqüenciadores automáticos, os diferentes ddNTPs são ligados a moléculas fluorescentes denominadas cromóforos que, quando estimuladas pelo raio laser do seqüenciador, emitem diferentes comprimentos de ondas, que são convertidos em bases nitrogenadas (A, T, G ou C), determinando assim a ordem de nucleotídeos do fragmento de DNA de interesse.

O maior avanço do seqüenciamento automático é a utilização do laser e programas de computadores específicos. Além disso, cada ddNTP é marcado com uma molécula fluorescente que, quando excitada pelo laser, emite comprimentos de onda para cada tipo de base associada. Dessa forma, não há necessidade de fazer quatro reações independentes para cada fragmento a ser seqüenciado. Uma das etapas mais complicadas é o preparo do gel de poliacrilamida e a realização da eletroforese. Entretanto, nos seqüenciadores mais modernos, a eletroforese ocorre no interior de microcapilares preenchidos com uma matriz linear de poliacrilamida, que pode ser facilmente substituída a cada eletroforese, facilitando ainda mais o sequenciamento, além de aumentar a velocidade de leitura (FARAH, 2007).

Após o sequenciamento de bibliotecas genômicas, os fragmentos de DNA, que possuem um alto grau de sobreposição, são remontados de modo a produzir seqüências maiores (*contigs*) que, por fim, formarão a seqüência final, ininterrupta. Esta última etapa é impossível de ser realizada sem ferramentas apropriadas de bioinformática.

Genômica Funcional

De nada adianta propor projetos genoma, com extensivas etapas de seqüenciamento, se, no final do processo, não for possível entender a função e a inter-relação dos genes seqüenciados. A maneira mais objetiva de elucidar a função dos genes é estudar a expressão gênica. Este é exatamente o objetivo da Genômica Funcional e, de certa forma, também da Proteômica, que estudam, respectivamente, a expressão do RNA mensageiro e as proteínas.

Tecnologias para o Estudo da Expressão Gênica Diferencial

Convencionalmente, as análises dos padrões de expressão gênica eram conduzidas com genes pontuais, ou seja, poucos genes analisados de cada vez. As técnicas utilizadas eram o *northern blotting*, o ensaio de proteção da ribonuclease e o RT-PCR, hoje consideradas clássicas. Atualmente é muito empregada a técnica de RT-PCR quantitativa ou em tempo real, que possui grande especificidade e sobretudo sensibilidade (GIULIETTI et al., 2001), e tem se mostrado eficiente e precisa na quantificação da expressão gênica em ruminantes (MEEUSE et al., 2005; ZAROS, 2007; ZAROS et al., 2007; BRICARELLO et al., 2008).

O primeiro método de PCR em tempo real foi relatado por Higuchi em 1993, usando brometo de etídeo durante a amplificação e um termociclador modificado para irradiar as amostras com luz ultravioleta e então detectar o sinal de fluorescência com uma câmara CCD. Os sinais fluorescentes eram plotados em função do número de ciclos, fornecendo uma boa indicação da quantidade de produto de PCR gerado durante cada ciclo (WITTWER et al., 1997).

Com o objetivo de tornar esta técnica acessível à comunidade científica, Wittwer et al. (1997) adaptaram um primeiro protótipo do equipamento denominado LightCycler, que viria a ser um dos equipamentos mais utilizados e indicados para análises de expressão gênica. Este equipamento realiza rápidas quantificações da amplificação de DNA de seqüências específicas em 10 a 15 minutos, onde 30 ciclos de amplificação podem ser completados rotineiramente nesse período, minimizando os tempos de desnaturação e anelamento dos primers, aumentando, conseqüentemente, a especificidade e rendimento do produto.

Desde a descoberta da PCR, numerosas aplicações vêm sendo descritas para quantificação da expressão de RNAm, tais como o método semiquantitativo, quantitativo competitivo e, mais recentemente, PCR em tempo real. A introdução dessa nova metodologia baseada na cinética de fluorescência possibilita a quantificação do produto de PCR em tempo real, processo que combina amplificação e detecção em um só passo.

PCR em tempo real permite a quantificação de transcritos raros, além de detectar pequenas mudanças na expressão gênica. É fácil de ser executado, oferece a precisão necessária e produz resultados confiáveis, possíveis de serem reproduzidos em um período de tempo relativamente curto (PFAFFL, 2001).

Com o advento da era genômica, foram desenvolvidas tecnologias que permitem a análise da expressão gênica de centenas de genes simultaneamente. Isto tornou os estudos mais rápidos e eficientes, no entanto, aumentou a complexidade das análises, que devem então estar intimamente ligadas à bioinformática. Existem técnicas de estudo da expressão gênica em larga escala para todos os níveis de orçamento. Elas vão do *differential display* ("DDRT-PCR"), o seqüenciamento em larga escala de "ESTs", as bibliotecas de cDNA subtrativas, o "RaSH", do inglês – "rapid subtraction hybridization", a análise serial de expressão gênica ("SAGE"), o "MPSS" ("massively parallel signature sequencing"), até os macro e microarranjos de DNA e os genechips. Algumas destas tecnologias requerem a comparação com banco de dados, como o "SAGE", o "MPSS" e o "RaSH". Estes bancos de dados ainda não estão disponíveis para ovinos e caprinos, o que torna limitada a aplicação da tecnologia nestas espécies. Esta situação poderia ser contornada utilizando bancos de dados de espécies próximas, como os bovinos. No entanto, nem para esta espécie ainda existem bancos de dados adequados, situação que tende a se modificar em breve. A comparação com banco de dados de espécies mais distantes poderia ser feita, mas não de maneira eficiente, pelas próprias características das técnicas, que se utilizam de seqüências pequenas para identificar cada gene, o que torna mais difícil de encontrar, em bancos de dados, uma seqüência correspondente ou próxima.

A tecnologia de microarranjos consiste em fragmentos de DNA (oligonucleotídeos ou cDNA) imobilizados num arranjo ordenado sobre uma superfície sólida em alta densidade. Os RNAs mensageiros, ou mais propriamente, os cDNAs que serão testados são marcados com corantes fluorescentes. Os mais comuns são as cianinas (Cy3 e Cy5). Os microarranjos então são hibridizados com os cDNAs marcados provenien-

tes de amostras que se desejam comparar, sendo que cada cDNA é marcado com um fluoróforo diferente, de modo que o resultado seja uma hibridização competitiva. A intensidade de fluorescência para cada ponto é determinada pela varredura dos microarranjos por um scanner que possui lasers capazes de excitar os fluoróforos separadamente (MARQUES; SILVA et al., 2004). Se, por exemplo, a amostra controle foi marcada pelo fluoróforo verde (Cy3) e a amostra experimental foi marcada com o fluoróforo vermelho (Cy5), a hibridização competitiva pode levar a três tipos de resultados, a saber: pontos verdes indicam que o gene em questão se expressa predominantemente na amostra controle, e portanto é considerado *downregulated*. Pontos em vermelho indicam uma expressão exclusiva na situação experimental (*genes upregulated*). Pontos em amarelo indicam uma equivalência na expressão entre situação controle e experimental e é o resultado da combinação dos fluoróforos Cy3 e Cy5. (Fig. 3). Podem ocorrer também variações da tonalidade amarela, tendendo para o verde ou para o vermelho. Isto indica níveis de expressão entre as situações, que não são nem equivalentes, nem exclusivas de uma ou outra amostra. Outra alternativa é fazer a marcação das duas bibliotecas de cDNA com apenas um corante e testá-los em lâminas diferentes (sistema de uma cor). No caso dos genechips não é feita a hibridização competitiva. Ao invés disto, as amostras de RNA são hibridizadas separadamente em réplicas dos genechips.

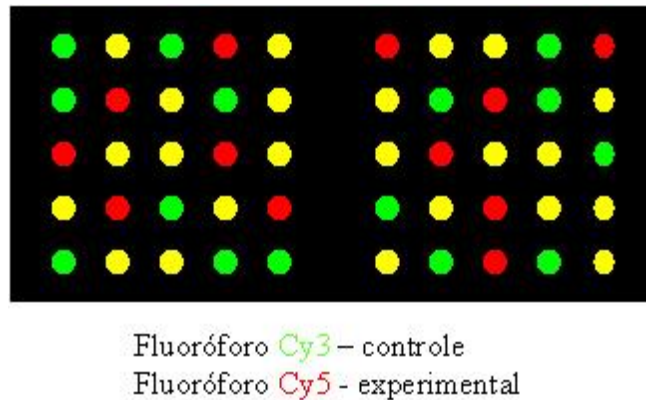


Fig. 3. Representação de microarranjo de DNA em menor escala.

Só existe até o momento um microarranjo de DNA descrito para ovinos (KEANE et al., 2006), que foi desenvolvido por um grupo neo-zelandês e utilizado no estudo da resistência genética à verminose. Para a espécie caprina ainda não foram descritos estes tipos de ferramentas. Além disso, também é muito comum recorrer-se à genômica comparativa, aplicando, por exemplo, microarranjos bovinos para testar cDNAs ovinos (DIEZ-TASCÓN et al., 2005). O mesmo princípio será utilizado em projeto a ser iniciado pela Embrapa Caprinos para testar cDNA de origem caprina (SIDER et al., 2008).

Proteômica

A Proteômica compreende conhecimentos e técnicas capazes não só de identificar um conjunto de proteínas produzidas por um tecido, como revelar as interações e interdependência dos processos biológicos. A cada gene corresponde um ou mais RNAs mensageiros. Por sua vez, a cada RNAm corresponde uma única proteína. A cada proteína é atribuída uma conformação espacial e, portanto, uma função na célula.

À semelhança do que ocorre com a Genômica Funcional, atualmente são disponíveis tecnologias que permitem amostrar centenas ou milhares de proteínas em géis bidimensionais. Para isto, as proteínas são separadas a partir do fracionamento de um extrato celular e a subsequente identificação de cada uma delas em eletroforese bidimensional: Na primeira dimensão, as proteínas são separadas por suas capacidades de protonação, através de seus pontos isoeletricos, em um gradiente de pH, que as distinguem em função da sua carga. Na segunda dimensão, as proteínas são separadas por suas massas moleculares relativas e posteriormente coradas para que possam ser visualizadas (Fig. 4).

Entretanto, é na espectrometria de massa que a proteômica tem encontrado uma de suas principais aliadas. A técnica é utilizada para identificar e sequenciar as proteínas. Neste processo, a proteína é excitada e fracionada em fragmentos menores, caracterizando o espectro de massas. As duas técnicas disponíveis, a desorção ionizante assistida por uma matriz, ("MALDI" (KARAS; HILLENKAMP, 1988), e a ionização por

eletrodispersão, "ESI" (FENN et al., 1989), são amplamente utilizadas na identificação e seqüenciamento de polipeptídeos. Ambas as técnicas podem ser combinadas com a medida em tempo de voo em alto vácuo (TOF). Além da identificação e seqüenciamento de polipeptídeos, a espectrometria de massas também é muito utilizada no estudo das modificações pós-traducionais (BISCH, 2004).

Outras ferramentas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), também podem auxiliar no estudo de frações protéicas.

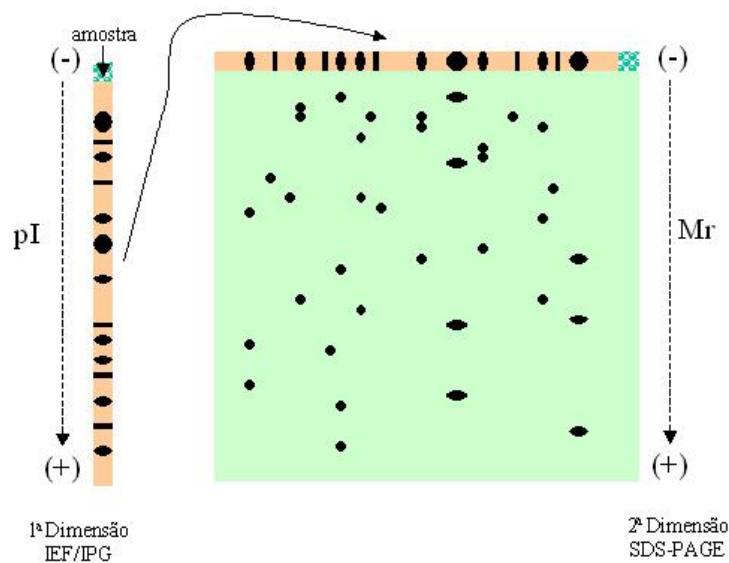


Fig. 4. Representação gráfica de um gel bidimensional.

Bioinformática

Devido ao crescente número de informações geradas pelos projetos genoma e proteoma, houve a necessidade do desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para processar o montante de informações, visando facilitar o acesso e compreensão dos pesquisadores.

A seqüência de tratamento dos dados gerados, denominada *pipeline*, inicia-se com as leituras das seqüências obtidas pelo sequenciador. Estas são

submetidas a um primeiro programa denominado PHRED (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998), que analisa a qualidade e alinha as seqüências por similaridade. A qualidade PHRED corresponde a um número inteiro entre 0 e 99 e está associada à probabilidade de erro de leitura. Uma base com qualidade 40 indica que o erro é de 1 base em 1000. Considera-se uma base como aceitável se tiver qualidade no mínimo 20 (1 base incorreta em 100). Após o alinhamento e atribuição do valor de qualidade, as seqüências são consideradas prontas para a próxima etapa do *pipeline*.

Esta segunda etapa consiste na utilização dos programas PHRAP (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998) e CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). O programa PHRAP lê os fragmentos já digitalizados (alinhados e com qualidade), procura encontrar redundâncias entre os mesmos e os une, formando seqüências maiores chamadas de consensos ou *contigs*. A montagem só é eficaz devido ao método aleatório de clonagem, que garante, estatisticamente, que sempre haverá redundância entre os fragmentos. Isso também garante a reconstituição da seqüência genômica original. Sem a redundância, não é possível reconstituir o genoma.

Essas etapas do tratamento bioinformático dos fragmentos de DNA são trabalhosas, mas podem ser também muito automatizadas. Tanto para genomas de procariotos, como de eucariotos, esse processo está bem dominado e a pesquisa nessa área se baseia em procurar novos algoritmos mais rápidos para montagem, mais confiáveis (por exemplo, que tratem automaticamente o problema de repetições) e que manipulem números cada vez maiores de fragmentos.

Entretanto, a conclusão da montagem do genoma não significa que ele já esteja completamete terminado. Para sua finalização, ainda há necessidade de se concluir o processo de anotação, abordado em seguida.

Anotação de Genomas

Este item também faz parte da bioinformática, porém tem ganhado importância cada vez maior com a necessidade de análise do grande número de dados gerados pelos diversos Projetos Genoma. É o que se chama comumente de “anotação” dos genomas.

A anotação é passo crucial para a finalização de um projeto genoma que, a rigor, gera seqüências sem sentido. Assim, ela procura encontrar a localização física das seqüências de DNA e descobrir onde estão os genes, os RNAs, os elementos repetitivos, os éxons e os íntrons, a região promotora, entre outras. Esta é conhecida como anotação em nível de nucleotídeos. Já a anotação em nível protéico, procura descobrir a provável função dos genes, identificando quais são aqueles que determinado organismo possui e quais ele não possui; e a anotação em nível de processo, onde se procura identificar as vias e processos nos quais diferentes genes interagem, montando uma anotação funcional eficiente (STEIN, 2001).

Nesta fase de anotação, compara-se a seqüência obtida com outras já depositadas nos bancos de dados, e cujas funções são previamente conhecidas. Neste caso, parte-se do princípio que seqüências estruturalmente similares devem ter funções também similares. Esse fato é que norteia a identificação biológica funcional gênica *in silico*.

Entretanto, antes de comparar seqüências gênicas desconhecidas com outras de função conhecida, é necessário identificar propriamente os genes do genoma. No caso de genomas de eucariotos, onde os genes são interrompidos por íntrons e éxons, o processo é um pouco mais complicado. Existem vários programas que realizam essa tarefa. Dois programas bastante utilizados são Glimmer (DELCHER et al, 1999) e Genemark (BORODOVSKY; MCININCH, 1993). O programa Glimmer procura na seqüência genômica de grandes ORFs (do inglês "Open Reading Frame") o códon de início e o de terminação. O Programa Genemark é mais preciso, pois considera também um modelo da região intergênica. Com um conjunto final de ORFs putativas, cada seqüência é então alinhada, ou seja, comparada com outras seqüências de função conhecida. Existem alguns bancos públicos, como o banco do Genbank (CNBI, 2008) e o Swiss Prot (2008), que são comumente utilizados como base de comparação.

As seqüências já identificadas também podem ser submetidas à caracterização pelo *Gene Ontology* (2008), que teve início a partir da necessidade de anotação do genoma da *Drosophila*, *Saccharomyces* e camundongo, em uma única linguagem que descrevesse os principais processos biológicos.

Essa necessidade em comum resultou no desenvolvimento de um conjunto de termos inseridos em categorias, que se associam aos produtos gênicos gerados.

As principais categorias geradas pelo *Gene Ontology* são: (1) componente celular, (2) processo biológico e (3) função molecular. Neste programa, um gene pode ser anotado em mais de uma categoria, visto que este pode ter mais de uma função, estar envolvido em uma variedade de processos e/ou desempenhar essa função em várias localidades celulares (HILL et al., 2001).

É rotina dos bioinformatas, biólogos e demais profissionais da área, verificar manualmente, ORF a ORF, utilizando um programa de edição pela Web, que permite aos anotadores modificarem as escolhas feitas pelo computador, alterando informações estruturais e/ou funcionais. O trabalho é considerado realizado quando o genoma está decodificado e minimamente anotado, com seus genes identificados e conferidos (CARRARO; KITAJIMA, 2002).

Nesse contexto, devido à grande importância das análises de Bioinformática para a Genômica e Proteômica, seria de grande importância que cada grande centro de pesquisa estivesse associado a um núcleo de Bioinformática. Além disto, centros menores podem contar com a consultoria destes núcleos. Sempre que um pesquisador delinear um experimento envolvendo Genômica ou Proteômica, a consulta ao bioinformata se faz necessária, da mesma forma que a consulta a um bioestatístico.

A Genômica, a Proteômica e a Bioinformática além de áreas que produzem informação própria, também são ferramentas para o estudo de outras subáreas da Biologia Avançada. Estas áreas serão abordadas a seguir.

Estudos de Biodiversidade (caracterização e conservação de recursos genéticos)

A caracterização de uma espécie é o primeiro passo rumo ao pleno conhecimento desta e é essencial para os estudos de conservação, melhoramento

genético e bioprospecção. A caracterização de um dado organismo vivo pode ser morfológica, fisiológica, bioquímica ou molecular. Na caracterização morfológica são registrados a forma e a estrutura dos diversos constituintes do organismo. Na caracterização fisiológica é feito o estudo da função de cada uma destas partes e inter-relação entre o funcionamento de outros tecidos/órgãos. No caso da caracterização bioquímica, são estudados os processos bioquímicos (reações que ocorrem no organismo) e, por fim, na caracterização molecular, o organismo é dissecado em nível molecular com estudos de estrutura, função e inter-relação entre as moléculas.

Um estudo típico de caracterização e conservação de mamíferos envolve as seguintes etapas: 1. conhecer a variabilidade genética, 2. restaurar a variabilidade (com o emprego de biotécnicas da reprodução e ferramentas de biologia molecular) e 3. a conservação propriamente dita.

Segundo o WWF-Brasil (2008), “o termo biodiversidade ou diversidade biológica descreve a riqueza e a variedade do mundo natural, que inclui as plantas, os animais e os microrganismos”.

As tecnologias genômicas podem ser empregadas como ferramentas para agregar valor aos estudos de biodiversidade, incluindo a caracterização, o melhoramento genético e a conservação das espécies. A Genômica engloba uma série de etapas que contribuem para a geração da informação necessária acerca dos genes e suas funções. Estas etapas vão desde a chamada Genômica Estrutural, que inclui o mapeamento do genoma passando por extensivas etapas de seqüenciamento gênico, até os estudos de expressão gênica, que fazem parte da Genômica Funcional.

É possível localizar dentro de um cromossomo os genes envolvidos com certas características de interesse dentro de um cromossomo por meio de ferramentas de mapeamento gênico. Da mesma forma, pode-se acessar a posição deste gene em relação a outros genes. Com o seqüenciamento do DNA, é possível detalhar a informação até o nível dos nucleotídeos (unidades mínimas básicas) que o constituem.

De posse destas ferramentas, a análise comparativa de diferentes genomas permite estabelecer a correspondência entre genes e outras características em diferentes organismos, possibilitando uma análise filogenética das mesmas. Por sua vez, estes estudos filogenéticos permitem entender os processos evolutivos responsáveis pela divergência entre dois genomas, por exemplo. É com base nestas comparações que hoje se sabe que muitas espécies de mamíferos, como o ser humano (*Homo sapiens*) e o camundongo (*Mus musculus*), possuem uma homologia (semelhanças estrutural) muito grande de seqüências, apesar de bem distintas entre si. É de se esperar que, quanto maior a homologia genética, menor a distância filogenética entre espécies. Diferentemente, uma grande distância filogenética não implica que dois organismos distintos não tenham qualquer homologia. De fato, existem inúmeros genes conservados entre organismos tão diferentes como os mamíferos e as bactérias. Sabe-se hoje que as diferenças gênicas residem em grande parte nas alterações de alguns poucos nucleotídeos (mutações pontuais). O estudo destas diferenças é útil tanto na comparação entre espécies diferentes quanto na comparação de indivíduos da mesma espécie (polimorfismos). Estas alterações pontuais são chamadas de polimorfismos de base única ("SNPs" – do inglês "Single Nucleotide Polymorphisms").

Um dos caminhos que os estudos de biodiversidade podem seguir é o do melhoramento genético molecular. Neste caso, as ferramentas de mapeamento gênico são também muito utilizadas, especialmente na seleção assistida por marcadores. Os QTLs (do inglês – "Quantitative Trait Loci") são um tipo de marcadores moleculares, constituídos por estruturas conhecidas como microssatélites (regiões de DNA de seqüência repetitiva). Estes QTLs (constituídos por regiões microssatélites) podem estar situados relativamente próximos aos genes que afetam características quantitativas, como peso, altura, produção leiteira, entre outras. Esta distância é suficientemente pequena para permitir a associação de um dado fenótipo ao QTL em questão. Este então pode se tornar um marcador molecular com aplicação na seleção assistida por marcadores. Outros tipos de marcadores também muito utilizados são os "RFLPs" e, mais recentemente, os "SNPs". Uma associação positiva entre o marcador e a

característica de interesse indica a região do genoma, mas não necessariamente o gene responsável pela característica. No entanto, para fins de utilização na seleção assistida por marcadores, este marcador já é suficiente. Se for necessário, é possível se chegar ao gene exato com ferramentas como a clonagem posicional.

Finalmente, a genômica funcional, que envolve estudos de expressão gênica em larga escala, pode servir tanto como ferramenta adicional em estudos comparativos, procurando elucidar mecanismos biológicos em comum entre espécies diferentes, como constituindo uma abordagem auxiliar na procura de genes associados a características de interesse (seleção assistida por marcadores).

Recentemente, pesquisadores da Embrapa Caprinos concluíram dois projetos de pesquisa sobre a caracterização e conservação de raças caprinas (SILVA et al., 2005; ARAÚJO, et al., 2005). A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia também possui o Programa Brasileiro de conservação de recursos genéticos animais (EGITO et al., 2002). Entre outras espécies, este programa apresenta frentes de conservação de ovinos e caprinos, principalmente na região Nordeste.

Bioprospecção

Os organismos biológicos, plantas, animais e microrganismos, têm o grande potencial de fornecer alimentos, princípios ativos de medicamentos e boa parte da matéria-prima industrial consumida pelo ser humano. A coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos neste sentido é conhecida como bioprospecção. De modo geral, é o método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em determinado local (SANTOS et al., 2001). A bioprospecção tem como principal finalidade a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais.

Apesar da maioria das substâncias naturais promotoras de saúde humana ser de origem vegetal (KUHN, 1998), os pequenos ruminantes também podem ser explorados, principalmente como fonte de alimentos, em especial

aqueles chamados nutracêuticos, ou alimentos funcionais, que possuem propriedades fisiológicas/biológicas que vão além das propriedades nutritivas. O leite de cabra e seus derivados têm sido explorados neste sentido. A Embrapa Caprinos e Ovinos tem investido na produção de queijos tipo coalho por meio da adição de bactérias probióticas (SANTOS et al., 2008).

A carne ovina, à semelhança da de origem bovina, tem sido considerada um alimento pouco saudável, devido à fração lipídica que a caracteriza (PRATES; MATEUS, 2002). No entanto, é possível diminuir o teor de ácidos graxos saturados e gordura trans, aumentando-se a proporção de ácidos graxos poli-insaturados na dieta dos animais (GEAY et al., 2001). Foi demonstrado que a carne de origem caprina é pouco gordurosa, superando inclusive a carne de frango neste quesito (CAVALCANTE, 2008).

Há também a possibilidade de estudar moléculas específicas provenientes de amostras biológicas como o leite, o sêmen e outras, com a finalidade de investigar propriedades farmacológicas nestas. Foi relatado que proteínas do soro do leite coalhado apresentam atividade anticancerígena em humanos (McINTOSH et al., 1998). No mesmo material foram também encontrados peptídeos opiáceos e peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina I (LEPPALA, 2001). O ácido linoléico conjugado (CLA), que pode ser encontrado na carne, possui atividade anticancerígena.

Prospecção de Genes

Até pouco tempo atrás, o enfoque das pesquisas científicas consistia em conhecer, inicialmente, uma determinada função biológica e, em seguida, buscar o gene responsável por esta característica. Atualmente, com o advento da Genômica e com o conseqüente grande volume de genes sendo descobertos dia após dia, a situação se inverteu. Agora são estes genes, em sua maioria desconhecidos, que demandam caracterização (MALONE et al., 2006). Este processo inverso de caracterização se denomina prospecção de genes.

A prospecção de genes é um dos desafios atuais da ciência. Profissionais da bioinformática, em parceria com biólogos, precisam analisar grandes

volumes de informação. A prospecção de genes, embora tenha avançado bastante nos últimos tempos, ainda se constitui numa área a ser explorada, principalmente nos organismos eucarióticos.

O processo de prospecção de genes envolve tanto análises *in silico* (bioinformática) como análises moleculares. O processo se inicia com a procura de seqüências gênicas nos bancos de dados disponíveis. Estas seqüências são então alinhadas umas com as outras de modo que sejam identificadas as seqüências similares, ou domínios conservados. Com esta informação são então construídos oligonucleotídeos iniciadores (primers) degenerados, que são pequenas seqüências de DNA contendo mais de uma combinação de bases, permitindo com que seqüências com pequenas diferenças sejam amplificadas igualmente. Em paralelo a isto, são construídas bibliotecas de cDNA a partir de RNA extraído de determinados tecidos, que são então submetido à transcrição reversa. Finalmente é feita a triagem destas bibliotecas de cDNA por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers degenerados (MALONE et al., 2006).

Melhoramento Genético (seleção assistida por marcadores)

A seleção é a base do melhoramento genético animal. Esta consiste na escolha mais adequada dos indivíduos que produzirão descendentes, levando em consideração aquelas características morfológicas e/ou produtivas que se deseja ver expressas na geração seguinte. Deste modo, a seleção é uma ferramenta que tem o objetivo de melhoria ou fixação de alguma característica de importância e aumentar, na população, a frequência de alelos favoráveis.

A seleção pode ser fenotípica, ou seja, baseada na observação das características visíveis ou mensuráveis de um indivíduo, produzidas pela interação entre genes e ambiente. A seleção fenotípica é bastante utilizada pelos produtores, sobretudo porque não necessita de qualquer análise adicional. No entanto, deve-se levar em conta que nem sempre as características visíveis ou mensuráveis são herdadas. De qualquer forma, a observação das características fenotípicas é essencial para as análises dos dois tipos de

seleção genotípica abordados a seguir. A seleção genotípica (baseada no genótipo) se divide em quantitativa ou molecular. Na seleção genotípica quantitativa, dados fenotípicos relacionados a características de interesse econômico são analisados por fórmulas matemáticas complexas, que permitem calcular as medidas de herdabilidade de cada característica. Além disso, fornecem informações acerca dos reprodutores que mais efetivamente transmitem essa característica para seus descendentes. Finalmente, a seleção genotípica molecular é uma nova e importante ferramenta para o melhoramento genético animal que tem como princípio a busca por genes candidatos associados às características de interesse e a sua aplicação como marcadores moleculares na seleção assistida por marcadores. Para isso, são utilizados testes de DNA, cuja técnica promete ser rápida e confiável, de modo que seus altos custos de implantação e execução sejam logo recuperados. Esta forma de seleção, como qualquer outra, também requer a informação fenotípica.

A seleção assistida por marcadores possui três ferramentas de estudo para chegar aos genes candidatos: o mapeamento genético, a busca do gene principal e a expressão gênica diferencial (genômica funcional).

O primeiro caminho, que também é a abordagem mais clássica, é o mapeamento genético através do estudo de *loci*, ou regiões cromossômicas que afetam características quantitativas (como produção leiteira, maciez da carne, desenvolvimento ponderal, resistência a doenças, entre outras). Esses são os chamados "QTLs" (do inglês "*quantitative trait loci*"), ou ainda "ETLs" ("*economic trait loci*"), e consistem na análise de regiões específicas do cromossomo (os microssatélites) de todos os indivíduos de grandes famílias de animais formadas por acasalamentos direcionados. Esses estudos permitem o estabelecimento de correlações entre o perfil dos microssatélites e o desempenho produtivo dos animais testados. Assim, é possível mapear os cromossomos tentando identificar a localização dos genes envolvidos com determinada característica de produção. Uma determinada região de QTL pode gerar por si só um marcador genético sem, necessariamente, identificar o gene ou os genes responsáveis pelo fenótipo.

O segundo caminho, denominado busca do gene principal, baseia-se no conhecimento prévio dos mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação das características de produção em questão e na tentativa de pesquisar as variações na seqüência (polimorfismos) ou na expressão de genes específicos (enzimas, hormônios, receptores ou outras proteínas) entre indivíduos que apresentem fenótipos distintos. É uma abordagem limitada, uma vez que trabalha com um ou poucos genes de cada vez, e sabe-se que a maioria das características fisiológicas são determinadas por vários genes.

Finalmente, a utilização da terceira abordagem, o estudo da expressão gênica diferencial (genômica funcional), tem crescido a cada dia. Esta abordagem baseia-se no princípio de que os animais que apresentam características fenotípicas diferentes, possam diferir tanto qualitativamente quanto quantitativamente na produção de RNA mensageiro (RNAm) e, conseqüentemente, na expressão da proteína que o mesmo codifica. As técnicas de análise de expressão gênica em larga escala permitem estudar inúmeros genes simultaneamente, identificando aqueles que estejam diferencialmente expressos e eventualmente agrupá-los quanto ao seu envolvimento em diferentes situações fisiológicas e/ou patológicas. A genômica funcional, na maioria dos casos, ainda é uma abordagem dispendiosa e relativamente demorada, pois apesar de indentificar genes candidatos, não produz marcadores prontos para serem aplicados na seleção assistida por marcadores.

Recentemente criada, a Genética Genômica visa integrar as tecnologias de mapeamento gênico e da genômica funcional. Suas ferramentas principais são os "QTLs" de expressão ("eQTLs"), que combinam as genotipagens aos microarranjos de DNA.

Apesar de todos os esforços, a seleção assistida por marcadores ainda não está sendo plenamente aplicada ao melhoramento de ovinos e caprinos, em parte em função da escassez de informação genética nestas espécies, principalmente em caprinos. Enquanto não se dispõe deste tipo de informação, esta limitação pode ser superada com a utilização de ferramentas de genética molecular e genômica comparativas.

Estudos recentes em diversas unidades da Embrapa têm investido na identificação de genes candidatos associados à resistência genética à verminose gastrointestinal em ovinos. Algumas regiões cromossômicas, como o cromossomo 3 (GOUVEIA et al., 2007) e o cromossomo 20 (dados não publicados), estão sendo estudadas quanto à sua associação à resistência genética à verminose. Essas regiões são conhecidas por conter genes do sistema imune, como o interferon gama e as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP), respectivamente, que participam da resposta parasita-hospedeiro. Além disso, a Embrapa Caprinos e Ovinos está iniciando uma linha de pesquisa que visa a identificação de genes candidatos associados à resistência à verminose em caprinos por meio de ferramentas de genética molecular (genotipagens de marcadores) e de expressão gênica diferencial pontual (PCR em tempo real) e global (microarranjos de DNA; SIDER et al., 2008).

Diante de todas estas perspectivas de avanço, acredita-se que dentro de poucos anos já terão sido identificados genes candidatos passíveis de aplicação na seleção assistida por marcadores, não só para a resistência genética à verminose, mas para outras características produtivas de interesse.

Transformação Genética (Transgenia)

A clonagem já é uma realidade em pequenos ruminantes e pode-se dizer que a transgenia também. Existe hoje um grande interesse mundial na expressão de transgenes (modificações da informação genética de um organismo por meio da tecnologia de DNA recombinante) na glândula mamária de espécies de aptidão leiteira. Os ovinos já se mostraram excelentes modelos para a clonagem, realizada por transferência nuclear, a partir de células embrionárias e somáticas (CAMPBELL et al., 1996), e também para a clonagem associada à transgenia (SCHNIEKE et al., 1997). Atualmente as cabras são também ótimos modelos para a transgenia. A espécie caprina tem sido atualmente a espécie de escolha para a realização da transgenia por apresentar uma alta produção de leite e por possuir algumas vantagens em relação à espécie bovina, como a prolificidade (o parto gemelar é muito comum), um período de gestação menor (150 dias em comparação aos 9 meses da vaca) e menor intervalo entre partos, que

aumentam a vida útil do animal e um menor custo de manutenção.

O Brasil produziu recentemente o primeiro caprino transgênico da América Latina. O grupo de pesquisa cearense responsável, com parceria de outros estados e também de outros países, tentou inicialmente padronizar os procedimentos reprodutivos necessários para a produção de animais transgênicos. Foram produzidos animais após a microinjeção pronuclear de embriões, no entanto, nenhum se comprovou ser transgênico (FREITAS et al., 2003). Apesar do insucesso em produzir animais transgênicos, o grupo foi eficiente na padronização das tecnologias reprodutivas a serem empregadas com esta finalidade de gerar os transgênicos. Tanto é que, em estudo posterior, o grupo teve sucesso em produzir "Carlos", um macho transgênico para o gene do fator estimulante de colônia de granulócitos humano, hG-CSF (FREITAS et al., 2007). O hG-CSF é um fator de crescimento hematopoiético utilizado para prevenir a neutropenia e a leucopenia induzidos por procedimentos como radiação e quimioterapia intensiva em humanos. Este fator também pode ser aplicado no tratamento de pacientes imunossuprimidos, no infarto do miocárdio e na isquemia cerebral. A hipótese de trabalho era a de que um pequeno rebanho transgênico expressando este fator poderia suprir todo o Brasil na produção do hG-CSF.

As principais etapas da construção do animal transgênico foram: o desenvolvimento do DNA a ser introduzido (fusão dos genes hG-CSF e alfa s1-caseína), a superovulação e fertilização das fêmeas, a coleta de embriões e a visualização dos mesmos em microscópio para a identificação dos dois pronúcleos (o embrião a ser microinjetado deve estar no estágio de uma única célula). Em seguida a microinjeção do DNA exógeno (fusão dos genes) em pronúcleo e a transferência dos embriões manipulados para receptoras sincronizadas. Depois do nascimento dos animais foi feita a confirmação da incorporação do transgene pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Recentemente, o grupo mudou de estratégia e vem tentando a produção de transgênicos por meio de outra técnica, a transferência nuclear (clonagem). Alguns animais inclusive já nasceram por este procedimento,

incluindo três transgênicos (dois machos e uma fêmea).

Recentemente, o grupo cearense formou uma parceria com um grupo norte-americano para a produção de caprinos transgênicos para a enzima lisozima humana (MAGA et al., 2006a), fator antimicrobiano cujo emprego em crianças e animais jovens está associado a um rearranjo da microflora intestinal e, portanto, à diminuição da ocorrência da diarreia infantil (BRUNDIGE et al., 2008; MAGA et al., 2006b).

Biossegurança

A Biossegurança é o conjunto de normas e medidas relacionadas à prevenção, minimização ou eliminação de riscos associados às atividades de produção, pesquisa e desenvolvimento tecnológico que possam ameaçar a saúde humana, dos animais ou do meio ambiente, além de influenciar na qualidade dos trabalhos desenvolvidos (DEFFUNE; PARDINI, 2004).

As medidas preventivas são delineadas de acordo com os agentes de risco, que podem ser físicos, químicos ou biológicos.

Os equipamentos de proteção individual (EPI), como avental, luvas, óculos de proteção e máscara constituem barreiras entre o agente contaminante e o usuário. Além disso, existem os equipamentos de proteção coletiva (EPC) como as cabinas de segurança biológica e química, que constituem uma barreira mecânica que evita a fuga de aerossóis para o ambiente do laboratório, minimizando o contágio por inalação. Duchas, lava-olhos e extintores de incêndio também são considerados EPC (DEFFUNE; PARDINI, 2004). Uma das principais contribuições da Biossegurança é o conjunto de normas, as Boas Práticas Laboratoriais (BPL), que dizem respeito à organização e ao delineamento de procedimentos laboratoriais e de campo. Essas normas incluem também os procedimentos de embalagem e transporte de amostras, bem como da coleta e processamento de resíduos (DEFFUNE; PARDINI, 2004).

A Biossegurança, bem como a Bioinformática, se relacionam com todas as outras subáreas da Biologia Avançada, sendo que a Biossegurança dita

como o pesquisador deve proceder nos seus experimentos em prol da sua segurança, a de seus colegas, dos animais e do meio-ambiente.

Projetos Envolvendo Diversas Subáreas da Biologia Avançada na Produção de Pequenos Ruminantes

Genoma Ovino

Recentemente foi criado um consórcio mundial (International Sheep Genomics Consortium – ISGC) encabeçado por alguns grupos de pesquisa australianos no sentido de mapear e seqüenciar o genoma ovino. O Brasil participa deste consórcio através da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Até o momento, foi produzida uma biblioteca BAC (concluída em 2002), que consiste de 203.000 clones recombinantes com o tamanho médio de 184Kb e representa uma cobertura de aproximadamente 12 a 14 vezes do genoma ovino.

No momento existem 210.025 ESTs depositadas no NCBI (2008). Grande parte destas ESTs foi seqüenciada por laboratórios do consórcio. Também está programado o desenvolvimento de um “SNP chip” de alta densidade. O SNP chip é uma espécie de genechip, onde são imobilizados centenas ou milhares de SNPs. Esses arranjos têm como finalidade realizar genotipagens rápidas e eficientes.

Projeto BioBode

No mesmo sentido, um projeto brasileiro de grande porte, apoiado financeiramente pela FINEP, intitulado Desenvolvimento de Biotecnologias para Promoção Socioeconômica Sustentável da Caprinocultura e mais conhecido como BioBode, está sendo iniciado. O projeto envolve várias instituições de pesquisa nordestinas, incluindo a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), a Universidade Federal do Ceará (UFC), a Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) e a Embrapa Caprinos e Ovinos.

O BioBode visa a aplicação da Conservação da biodiversidade, a Genômica

Funcional, a Proteômica, a Bioformática e a Prospecção de genes em prol do aumento da informação genética em caprinos. Suas metas são basicamente as seguintes:

- Identificar, pelo menos, 10.000 "ESTs" da glândula mamária e de tecidos do sistema reprodutor masculino de caprinos da raça Moxotó;
- Caracterizar 100 proteínas diferencialmente expressas no leite e no sêmen de caprinos da raça Moxotó, criados sob diferentes condições nutricionais, sanitárias e variadas formas de manejo;
- Formar um banco de dados moleculares visando a mineração de dados e a obtenção de marcadores moleculares para qualidade do leite e eficiência reprodutiva;
- Prospecutar o potencial biotecnológico de genes e proteínas caprinas;
- Formar um rebanho com pelo menos 50 caprinos da raça Moxotó.

Considerações finais

Pelo exposto, é possível ter uma idéia do panorama das pesquisas em Biologia Avançada na produção de pequenos ruminantes realizadas até o momento, bem como do seu potencial. Pesquisadores de várias regiões do Brasil já despontam neste cenário com iniciativas empreendedoras, mas ainda há muito a ser explorado, principalmente na espécie caprina. A demanda é grande e há necessidade de aumentar e capacitar recursos humanos, além de equipar os laboratórios existentes e aqueles em construção. Com isso, é possível projetar que em aproximadamente uma década o cenário de informação genética de pequenos ruminantes esteja equiparado ao de bovinos. É importante que se tenha em mente que a geração de informação gênica deva ter continuidade nos estudos funcionais, onde equipes multidisciplinares possam atribuir as mais variadas aplicações em suas respectivas áreas de atuação.

Referências

- ADAMS, M.D.; KELLY, J.M.; GOCAYNE, J.D.; DUBNICK, M.; POLYMERPOULOS, M.H.; XIAO, H.; MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.F.; KERLAVAGE, A.; McCOMBIE, W.R.; VENTER, J.C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v. 252, p.1651-1656, 1991.
- ARAÚJO, A. M. de; CARVALHO, G. M. C.; SILVA, A. G. S. da; SOUSA JÚNIOR, L. de; FONSECA, C. G. da; PINTO, U. A.; FREITAS, V. J. F.; SILVA, F. L. R. da; PINHEIRO, A. A.; PINHEIRO, R. R. **Caracterização, recuperação e manutenção da variabilidade genética em rebanhos de conservação de caprinos de raças naturalizadas no Nordeste**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2005. 26 f. (Embrapa. Macroprograma 2 – No. 02.04.202.00). Projeto concluído.
- BISCH, P. M. Genômica funcional: proteômica. In: MIR, L. (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 139-162.
- BORODOVSKY, M.; MCININCH, J. D. GeneMark: parallel gene recognition for both DNA strands **Comparative Chemistry**, v. 17, p.123-133, 1993.
- BRICARELLO, P.A.; ZAROS, L.G.; COUTINHO, L.L.; ROCHA, R.A.; SILVA, M.B.; KOOYMAN, F. N.; DE VRIES, E.; YATSUDA, A.P.; AMARANTE, A.F. Immunological responses and cytokine gene expression analysis to *Cooperia punctata* infections in resistant and susceptible Nelore cattle. **Veterinary Parasitology**, v.155, n. ½, p.95-103, Aug. 2008.
- BRUNDIGE, D. R.; MAGA, E.A.; KLASING, K.C.; MURRAY, J.D. Lisozyme transgenic goat's milk influences gastrointestinal microflora in young pigs. **Journal of Nutrition**, v.138, p.921-926, 2008.
- CAMPBELL, K.H.; MCWHIR, K.; RITCHIE, W.A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, v.380, p.64-66, 1996.

CARRARO, D.C.; KITAJIMA, J.P. Sequenciamento e bioinformática de genomas bacterianos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 28, p. 16-20, 2002.

CAVALCANTE, A. C. R. (Ed.). **Sabores das carnes caprina e ovina**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sobral, Embrapa Caprinos, 2008. 87 p.

CRAWFORD, A.M.; DOODS, K.G.; EDE, A.J.; PIERSON, C.A.; MONTGOMERY, G.W.; GARMONSWAY, H.G.; BEATTIE, A.E.; DAVIS, K.; MADDOX, J.F.; KAPPES, S.W.; STONE, R.T.; NGUYEN, T.C.; PENTY, J.M.; LORD, E.A.; BROOM, J.E.; BUITKAMP, J.; SCHWAIGER, W.; EPPLIN, J.T.; MATTHEW, P.; MATTHEWS, M.E.; HULME, D.J.; BEH, K.J.; MCGRAW, R.A.; BEATTIE, C.W. An autosomal genetic linkage map of sheep genome. **Genetics**, v.140, p.703-724, 1995.

DEFFUNE, E.; PARDINI, M. I. M. C. Biossegurança para laboratórios. In: MIR, L. (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 23-41.

DELCHER, A. L.; HARMON, D.; KASIF, S.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L. Improved microbial gene identification with Glimmer. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 23, p. 4636-4641, 1999.

DIEZ-TASCÓN, C.; KEANE, O.M.; WILSON, T.; ZADISSA, A.; HYNDMAN, D.L.; BAIRD, D.B.; McEWAN, J.C.; CRAWFORD, A.M. Microarray analysis of selection lines from outbred populations to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. **Physiology and Genomics**, v. 21, p. 59-69, 2005.

EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. **Archives of Zootecny**, v.51, p.39-52, 2002.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p.186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p.175-185, 1998.

FARAH, S. B. **DNA segredos e mistérios**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 560 p.

FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, p. 64.71, 1989.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FREITAS, V. J. E.; SEROVA, I. A.; ANDREEVA, L. E.; DVORYANCHIKOV, G. A.; LOPES JÚNIOR, E.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; DIAS, L.P.B.; AVELAR, S.R.G.; MOURA, R.R.; MELO, L.M.; PEREIRA, A.F.; CAJAZEIRAS, J.B.; ANDRADE, M.L.L.; ALMEIDA, K.C.; SOUSA, F.C.; CARVALHO, A.C.C.; SERO, O.L. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor, (hG-CSF) gene in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p.585-592, 2007.

FREITAS, V.J.E.; SEROVA, I.A.; ANDREEVA, L.E.; LOPES JÚNIOR, E.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; CORDEIRO, M.F.; RONDINA, D.; ARRUDA, P.I.J.; LIMA VERDE, J.B.; DVORIANCHIKOV, G.SEROV, O. Birth of kids after microinjection of pronuclear embryos in a transgenic goat (*Capra jircus*) production program in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 200-205, 2003.

GALLOWAY, S.M.; HANRAHAN, V.; DODDS, K.G.; POTTS, M.D.; CRAWFORD, A.M.; HILL, D.F. A linkage map of the ovine X chromosome. **Genome Research**, v. 6, p. 667-677, 1996.

GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J.F.; CULIOLI, J. Effect of

nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. Reproduction. **Nutrition and Development**, v. 41, p.1-26, 2001.

GENE ONTOLOGY. **Gene Ontology [Home page]**. Disponível em: <<http://www.geneontology.org/>>. Acesso em: 25 set. 2008.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DACALLONE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p.386-401, 2001.

GOUVEIA, J.J.S.; SANTIAGO, A.C.; IBELLI, A.M.G.; FREITAS, A.R.; OLIVEIRA, M.C.S.; GIGLIOTI, R.; ESTEVES, S.N.; REGITANO, L.C.A. Análise de associação entre marcadores moleculares no cromossomo 3 de ovinos e resistência aos nematódeos gastrintestinais In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2007. p. 154.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G. WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v.11, p.1026-1039, 1993.

HILL, D.P., DAVIS, A.P., RICHARDSON, J.P. Strategies for biological annotation of mammalian systems: Implementing gene ontologies in mouse informatics. **Genomics**, v. 74, p.121-128, 2001.

HUANG, X.; MADAN, A. Cap3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, p.2299-2301, 1988.

KEANE, O.M.; ZADISSA, A.; WILSON, T.; HYNDMAN, D.I.; GREER, G.J.; BAIRD, D.B.; McCULLOCH, A.F.; CRAWFORD, A.M.; McEWAN, J.C. Gene expression profiling of Naïve sheep genetically resistant and susceptible to gastrointestinal nematodes. **BMC Genomics**, v. 7, p. 42-54, 2006.

KUHN, M. E. Functional foods overdose. **Food Processing**, v. 59, p. 21-48, 1998.

LEPPALA, A. P. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioids and ACE-inhibitory peptides. **Trends in Food Science Technology**, v. 11, p. 347-356, 2001.

LIU, B. H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611p.

MADDOX, J.F.; DAVIES, K.P.; CRAWFORD, A.M.; HULME, D.J.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E.P.; FREKING, B.A.; BEH, K.J.; COCKETT, N.E.; RIFFKIN, C.D.; DRINKWATER, R.; MOORE, S.S.; DODDS, K.G.; LUMSDEN, J.M.; VAN STIJN, T.C.; PHUA, S.H.; ADELSON, D.L.; BURKIN, H.R.; BROOM, J.E.; BUITKAMP, J.; CAMBRIDGE, L.; CUSHWA, W.T.; GERARD, E.; GALLOWAY, S.M.; HARRISON, B.; HAWKEN, R.J.; HIENDLEDER, S.; HENRY, H.M.; MEDRANO, J.F.; PATERSON, K.A.; SCHIBLER, L.; STONE, R.T.; VAN HEST, B. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. **Genome Research**, v. 11, p. 1175-1189, 2001.

MAGA, E. A.; WALKER, R. L.; ANDERSON, G. B.; MURRAY, J. D. Consumption of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland results in the modulation of intestinal microflora. **Transgenic Research**, v. 15, p. 515-519, 2006b.

MAGA, E.A.; SHOEMAKER, C.F.; ROWE J.D.; BONDURANT, R.H.; ANDERSON, G.B.; MURRAY, J.D. Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland.

Journal of Dairy Science, v. 89, p. 518-524, 2006a.

MALONE, G.; ZIMMER, P.D.; MENEGHELLO, G.E.; BINNECK, E.; PESKE, S.T. Prospecção de genes de Bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira de Agropecuária**, São Paulo, v.12, p. 7-13, 2006.

MARQUES, M. V.; SILVA, A. M. Genômica Funcional: Transcriptoma. In: MIR, L. (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.119-137.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings in the National Academy of Sciences USA**, v. 74, p. 560-564, 1977.

McINTOSH, G. H.; ROYLE, P.J.; LEU, R. K.; REGESTER, G. O.; JOHNSON, M. A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, v. 8, p. 425-434, 1998.

MEEUSEN, E.N.T.; BALIC, A.; BOWLES, V. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 121-125, 2005.

NCBI - National Center for Biology Information, National Library of Medicine. National Institutes of Health. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 05 out. 2008.

NONES, K. **Mapeamento de QTI no cromossomo 1 de *Gallus gallus* que influenciam características de desempenho e carcaça**. 120 f. 2004. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. e45, 2001.

PRATES, J. A. M.; MATEUS, C. M. R. P. Componentes com atividade fisiológica dos alimentos de origem animal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, p. 3-12, 2002.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, p. 441-448, 1975.

SANTOS, A. S. R. **Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da vida**. 2001. Disponível em: <<http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>>. Acesso em 11 julho 2008.

SANTOS, K. M. O. dos S.; EGITO, A. S. do; BENEVIDES, S. D.; ALVES, R. R. N.; SAAD, S. M. I. Elaboração de queijo de cabra maturado potencialmente probiótico utilizando *Lactobacillus acidophilus*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS EM PRODUTOS LÁCTEOS, 1., 2008, Campinas. [Resumos e palestras]. Campinas: ITAL, 2008. 1 f. 1 CD-ROM.

SCHIBLER, L.; VAIMAN, D.; OUSTRY, A.; GUINEC, N.; DANGY-CAYE, A.L.; BILLAULT, A.; CRIBIU, E. P. Construction and extensive characterization of a goat Bacterial Artificial Chromosome library with treefold genome coverage. **Mammalian Genome**, v. 9, p.119-124, 1998.

SCHNIEKE, A. E.; KIND, A.J.; RITCHIE, W.A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A.R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I.; COLMAN, A.; CAMPBELL, K.H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 278, p. 2130-2133, 1997.

SIDER, L. H. Biologia molecular para o melhoramento de caprinos e ovinos. **Portal do Agronegócio**. Seção Artigos. 12 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>> .

SIDER, L.H.; VIEIRA, L.S.; VILLELA, LC.V.; CAVALCANTE, A.C.R.; LOBO, R.N.B.; FACÓ, O.; REGITANO, L.C.A.; NICIURA, S.C.M.; PAIVA, S.R.;

CAETANO, A.R.; BENAVIDES, M.V.; COUTINHO, L.L.; GARCIA, J.F.; ZAROS, L.G.; CUNHA, R.M.S.; PINHEIRO, R.R. **Identificação de genes candidatos associados à resistência genética à verminose gastrointestinal em caprinos por meio de ferramentas moleculares e genômicas.** Sobral: Embrapa Caprinos, 2008. 67 f. (Embrapa. Macroprograma 2 – Melhoria Genética. No. 02.07.07.006.00.00). Projeto em andamento.

SILVA, F.L.R.; ARARIPE, F.A.M.; SANTOS JUNIOR, L.S.; SILVA, J.J.S.; SOUSA, V.F. **Variabilidade genética em rebanhos de conservação de caprinos de raças naturalizadas do Nordeste.** Sobral: Embrapa Caprinos, 2005. 16 f. (BNB-FUNDECI. Projeto de Pesquisa. No. 072/2005). Projeto concluído.

SILVA, A. C. da; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, R.L.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VAN SLUYS, M.A.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.; AMARAL, A.M. do; BERTOLINI, M.C.; CAMARGO, L.E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.P.; CICARELLI, R.M.; COUTINHO, L.L.; CURSINO-SANTOS, J.R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.B.; FERREIRA, A.J.; FERREIRA, R.C.; FERRO, M.I.; FORMIGHIERI, E.F.; FRANCO, M.C.; GREGGIO, C.C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.M.; KISHI, L.T.; LEITE, R.P.; LEMOS, E.G.; LEMOS, M.V.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M., MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MARTINS, E.C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C.F.; MIYAKI, C.Y.; MOON, D.H.; MOREIRA, L.M.; NOVO, M.T.; OKURA, V.K.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA, H.A.; ROSSI, A.; SENA, J.A.; SILVA, C.; SOUZA, R.F. de; SPINOLA, L.A.; TAKITA, M.A.; TAMURA, R.E.; TEIXEIRA, E.C.; TEZZA, R.I.; SANTOS, M. T. dos; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; WHITE, F.F.; SETUBAL, J.C.; KITAJIMA, J.P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.

SIMPSON, A.J.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S.; BARROS, M.H.; BONACCORSI, E.D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J.M.; BRIONES, M.R.; BUENO, M.R.; CAMARGO, A.A.; CAMARGO, L.E.;

CARRARO, D.M.; CARRER, H.; COLAUTO, N.B.; COLOMBO, C.; COSTA, F.F.; COSTA, M.C.; COSTA-NETO, C.M.; COUTINHO, L.L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A.P.; FERREIRA, A.J.; FERREIRA, V.C.; FERRO, J.A.; FRAGA, J.S.; FRANÇA, S.C.; FRANCO, M.C.; FROHME, M.; FURLAN, L.R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.; GOMES, S.L.; GRUBER, A.; HO, P.L.; HOHEISEL, J.D.; JUNQUEIRA, M.L.; KEMPER, E.L.; KITAJIMA, J.P.; KRIEGER, J.E.; KURAMAR, E.E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M.R.; LEITE, L.C.; LEMOS, E.G.; LEMOS, M.V.; LOPES, S.A.; LOPES, C.R.; MACHADO, J.A.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.; MADEIRA, H.M.; MARINO, C.L.; MARQUES, M.V.; MARTINS, E.A.; MARTINES, E.M.; MATSUKUMA, A.Y.; MENCK, C.F.; MIRACCA, E.C.; MIYAKI, C.Y.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MOON, D.H.; NAGAI, M.A.; NASCIMENTO, A.L.; NETTO, L.E.; NHANI, A. JR; NOBREGA, F.G.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, M.A.; DE OLIVEIRA, M.C.; DE OLIVEIRA, R.C.; PALMIERI, D.A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B.R.; PEREIRA, G.A.; PEREIRA, H.A. JR; PESQUEIRO, J.B.; QUAGGIO, R.S.; ROBERTO, P.G.; RODRIGUES, V., DE ROSA, V.E. JR; DE SÁ, R.G.; SANTELLI, R.V.; SAWASAKI, H.E.; DA SILVA, A.C.; SILVA, A.M. da; SILVA, F.R. da; SILVA JÚNIOR, W.A. da; SILVEIRA, J.F. da; SILVESTRI, M. L.; SIQUEIRA, W.J.; SOUZA, A.A. de; SOUZA, A.P. de; TERENCEZI, M.F.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; TSUHAKO, M.H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A.L.; ZAGO, M.A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J.C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. **Nature**, v. 406, p. 151-159, 2000.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. Genomics. In: PRICE, H.; SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. (Ed.). **Principles of genetics: study guide and problems workbook**. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. p. 553-584.

STEIN, L. Genome annotation: from sequence to biology. **Nature Reviews Genetics**, v.2, p.493-503, 2001.

SWISS-PROT. Protein knowledgebase TrEMBL Computer-annotated

supplement to Swiss-Prot. 2008. Disponível em: <<http://ca.expasy.org/sprot>>. Acesso em 15 set. 2008.

TABET-AOUL, K.; OUSTRY-VAIMAN, A.; VAIMAN, D.; SAÏDI-MEHTAR, N.; CRIBIU, E.P.; LANTIER, F. Cytogenetical anchoring of sheep linkage map and syntenic groups using a sheep BAC library. **Genetics, Selection and Evolution**, v.32, p. 441-457, 2000.

VAIMAN, D.; SCHIBLER, L.; BOURGEOIS, F.; OUSTRY, A.; AMIGUES, Y.; CRIBIU, E.P. A genetic linkage map of the male goat genome. **Genetics**, v.144, p.279-305, 1996.

WHITTWER, C.T.; HERRMANN, M. G.; MOSS, A.A.; RASMUSSEN, R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplifications. **Biotechniques**, v. 22, p. 134-138, 1997.

WWF-Brasil. World Wide Fund. Disponível em: <<http://www.wwf.org.br/index.cfm>>. Acesso em: 25 set. 2008.

ZAROS, L.G. **Descoberta e estudo de genes envolvidos na resposta a endoparasitas gastrintestinais em bovinos**. 122 f. 2007. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ZAROS, L.G.; BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T.; COUTINHO, L.L. Quantification of bovine cytokine expression using real-time RT-PCR methodology. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 575-579, 2007.