

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOCQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOCQUÍMICA


EXPRESSION GÊNICA DIFERENCIAL DE PLÁCIDO DE
PÊRER JEJUNAIS EM RELAÇÃO A REFORÇOS
MESENTERÍCOS JEJUNAIS DE VEJONES

Juliana Gomes Machado

UBERLÂNDIA-228

2004

N. REGISTRO 215758

 Universidade Federal de Uberlândia
DATA DA DEVOLUÇÃO

Esta obra deve ser devolvida na última data carimbada

VICER 175

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

SISBI/UFU



1000215758

*Expressão Gênica Diferencial de Placas de Peyer Jejunaes
em relação a Linfonodos Mesentéricos Jejunaes de Leitões*

Juliana Gouvêa Machado

UBERLÂNDIA – MG
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
585.7
11.1492
T.EE/MEM

*Expressão Gênica Diferencial de Placas de Peyer Jejunaís
em Relação a Linfonodos Mesentéricos Jejunaís de Suínos*

Juliana Gouvêa Machado
Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart
Co-orientador: Prof. Dr. Michael Murtaugh

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Bioquímica

UBERLÂNDIA – MG
2004

DEDICATÓRIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
BIBLIOTECA

Ⓟ SISBI/UFU
215758

FU000336843

FICHA CATALOGRÁFICA

M149e Machado, Juliana Gouvêa, 1977-
Expressão gênica diferencial de placas de peyer jejunais em relação a
linfonodos mesentéricos jejunais de leitões / Juliana Gouvêa Machado. -
Uberlândia, 2004.
62f. : il.
Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Suínos - Teses. 2. Leitão (Suíno) - Teses. 3. Linfonodos - Teses. 4.
Folículos linfáticos agregados - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 636.4 (043.3)

Dedico este trabalho aos meus pais, Itamar Cardoso Machado e Therezinha Gouvêa Machado, meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, meu co-orientador Dr. Michael Murtaugh e minha grande amiga Sandra Nogueira, a quem deixo os meus mais sinceros agradecimentos, pelo crédito de confiança, incentivo contínuo e apoio integral, fontes produtoras de coragem que serviram de motivação a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, pela força, pela minha família e amigos, pois sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço aos meu pais pelo total apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Agradeço ao meu orientador Dr.Luiz Ricardo Goulart, por ter me dado esta oportunidade de realizar o sonho do mestrado e ter depositado total confiança no meu trabalho.

Agradeço aos meus amigos do laboratório, pelos bons momentos: Rossana Vilela, Luciana Benedetti, Renata, Karina Marangoni, Paula, Guilherme, Carlos, Rone, Fausto, Cícero, Waldesse, Jaqueline, Fred, Katiana, Alexandra, Juliana Meola, Juliana Franco, Andréia, Ana Paula, Mércia, Elis Ana Cândida e Adriana.

Agradeço ao Dr.Michael Murtaugh, por ter aberto as portas do seu laboratório, onde o conhecimento que adquiri teve um enorme significado para minha vida profissional e pessoal, além de acreditar no meu potencial para a realização deste trabalho.

Agradeço aos amigos do laboratório do Dr.Michael: Kendra, Chad, Cheryl, Zhengguo, LaRae, Seth, Craig, Collen, Prasad, Satoshi, Martha, Carlos e Gongping por terem me auxiliado nas técnicas utilizadas neste trabalho e em todos os momentos que estive dentro da Universidade de Minnesota.

Agradeço a minha amiga Sandra Nogueira, que incentivou a minha ida para os EUA arrumando o estágio no laboratório do Dr.Murtaugh e pelo total apoio em todos os momentos em que lá estive.

Agradeço a todos os meus amigos de Dourados que sempre me incetivaram e nunca me esqueceram.

Agradeço aos amigos que fiz nos EUA que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis, durante o inverno!!

Agradeço ao prof. Heyder e ao Dr.Alexandre Caetano por terem aceito o convite para fazerem parte da banca de defesa e pelas críticas construtivas para a melhora deste trabalho.

Índice

Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Gráficos.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii
Resumo Geral.....	x
General Abstract.....	xi
Introdução Geral.....	1
• Sistema Imunológico Intestinal.....	1
• Placas de Peyer.....	3
• Linfonodos Mesentéricos	5
• Resposta Imunológica em placas de Peyer e linfonodos mesentéricos.....	6
• Microarray.....	9
Objetivos Gerais.....	11
Referências Bibliográficas.....	12
Capítulo Único: Expressão Gênica Diferencial de Placas de Peyer Jejunais em relação a Linfonodos Mesentéricos Jejunais de Leitões.....	15
Resumo.....	16
Abstract.....	17
Introdução.....	18
Materiais e Métodos.....	20
Resultados.....	30
Discussão.....	39
Conclusão.....	44
Referências Bibliográficas.....	45

Lista de Figuras

Figura 1:	Visão macroscópica de uma Placa de Peyer (PP) jejunal de suíno.....	4
Figura 2:	Organização da placa de Peyer (PP) jejunal (Kulkarni-Narla and Brown 2000).....	4
Figura 3:	Organização do linfonodo de suínos, mostrando que a posição da medula e zona cortical são invertidas.....	5
Figura 4:	Representação esquemática de elementos linfóides do sistema imunológico intestinal (Mowat 2003).....	7
Figura 5:	Captura de antígeno e reconhecimento por linfócitos T do intestino (Mowat 2003).....	8
Figura 6:	Agilent chip. Chip utilizado para análise de RNA.....	21
Figura 7:	Esquema de preparação das sondas de cDNA.....	24
Figura 8:	Designer do experimento, mostrando como foram feitas as hibridizações.....	24
Figura 9:	Imagem parcial do “pork chip” hibridizado com sonda produzida com PPj e MLNj. O chip é formado por 48 subarrays, de 8x16 spots, em duplicata.....	27
Figura 10:	Scatter plot mostrando o resultado das linhas de corte.....	31
Figura 11:	Cluster dos 33 genes super expressos em PPj e dos 10 genes super expressos em MLNj.....	34

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Genes utilizados como controle negativo e genes “housekeeping” para a realização das linhas de corte.....	26
Tabela 2:	Grupo de primers, seqüência de nucleotídeos dos primers e tamanho do produto de PCR em tempo real.....	29

Tabela 3:	Genes considerados mais expressos em PPj em relação aos MLNj.....	32
Tabela 4:	Genes desconhecidos considerados mais expressos em PPj em relação aos MLNj.....	33
Tabela 5:	Genes considerados mais expressos em MLNj em relação as PPj.....	33
Tabela 6:	Genes utilizados na técnica de PCR em tempo real, para a validação da técnica de microarray.....	35
Tabela 7:	Nível de expressão dos genes utilizados na PCR em tempo real.	36

Lista de Gráficos

Gráfico 1:	Correlação da expressão de genes aleatórios entre a técnica de microarray e PCR em tempo real.....	36
Gráfico 2:	Correlação da expressão de genes do grupo 1 entre a técnica de microarray e PCR em tempo real.....	37
Gráfico 3:	Correlação da expressão de genes do grupo 2 entre a técnica de microarray e PCR em tempo real.....	37
Gráfico 4:	Histograma mostrando a distribuição de genes presentes em 6 PPj normais de leitões.....	38

Lista de Abreviaturas

ADP	adenosina difosfato
APC	célula apresentadora de antígenos
ATP	adenosina trifosfato
cAMP	monofosfato de adenosina cíclico
°C	graus celsius
CCR19	receptor de quimiocina
CCR21	receptor de quimiocina
CCR7	receptor de quimiocina
CCR9	receptor de quimiocina
CD	célula dendrítica
CD2	grupo de diferenciação
cDNA	molécula de ácido desoxirribonucleotídeo complementar
cm	centímetros
Ct	cycle threshold
CV	coeficiente de variação
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato
DTT	dithiothreitol
EST	expression sequence tag
GALT	tecido linfóide associado ao intestino
H ⁺	hidrogênio
VEA	vênula endotelial alta
hrs	horas
IACUC	Institutional animal care and use committee
ICAM-1	molécula de adesão intercelular
IFN γ	interferon gama
IgA	imunoglobulina isotipo A
IL-1	interleucina 1
kg	kilograma
LFA-1	integrina de leucócito
LN	linfonodos
LPS	lipopolissacarídeos
m ²	metro ao quadrado
MadCAM-1	molécula de adesão celular 1 – adressina de mucosa
mg	miligrama
MHC	complexo de histocompatibilidade maior
min	minutos
MIP-3 β (CCL19)	proteína inflamatória de macrófagos
ml	mililitro
MLN	linfonodos do mesentério

μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
mM	milimolar
ng	nanograma
nM	nanomolar
nm	nanômetro
PBS	tampão de fosfato salino
PCR	reação em cadeia de polimerase
PMT	photomultiplier tube
PP	placas de Peyer
PPj	placas de Peyer jejunais
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	transcrição reversa – reação em cadeia de polimerase
mRNA	ácido ribonucléico (mensageiro)
seg	segundos
SED	dome subepitelial
SDS	duodecil sulfato sódico
SSC	citrato de sódio
TDA	área timo dependente
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
und	unidades
U of MN	Universidade de Minnesota
VCAM-1	molécula de adesão vascular
ΔCt	delta cycle threshold

RESUMO GERAL

Genes relacionados ao mecanismo de defesa do intestino apresentaram uma expressão aumentada em placas de Peyer jejunais (PPj) de leitões saudáveis. No presente estudo, a tecnologia de microarray foi utilizada com o objetivo de analisar o perfil da expressão gênica de PPj em relação aos linfonodos mesentéricos jejunais (MLNj). Placas de Peyer jejunais e MLNj de 6 leitões saudáveis entre 6 e 7 semanas de idade foram coletados. RNA total foi extraído das amostras e RNA de PPj de cada animal e um pool de RNA de MLNj de todos os animais foram utilizados para a construção da sonda de microarray. As hibridizações de microarray foram realizadas em duplicata invertendo as moléculas fluorescentes (Cy5 e Cy3). Dos 2.644 genes presentes no chip de microarray, chamado "pork chip", 33 apresentaram uma expressão aumentada em PPj em relação aos MLNj. A maioria destes apresentou uma função relacionada à processos celulares e ao metabolismo celular normal; e 6 ainda são genes com funções desconhecidas. Dez genes mostraram mais expressão em MLNj em relação a PPj, 3 relacionados ao processamento de antígenos e 7 com funções desconhecidas. A precisão da técnica de microarray foi verificada utilizando-se a técnica de PCR em tempo real, genes aleatórios foram escolhidos e mostraram uma expressão consistente entre as técnicas.

Utilizando MLNj como referência para analisar o perfil da expressão gênica de PPj foi encontrado uma expressão aumentada de genes relacionados ao mecanismo de defesa do intestino e genes relacionados ao metabolismo celular. Dessa forma pôde-se observar que a técnica de microarray mostrou-se precisa para a análise de expressões gênicas.

GENERAL ABSTRACT

Genes with respect to the gut defense appeared to be more expressed in the Peyer's patches (PPj) of healthy young pigs. In this study, the cDNA microarray technique was utilized to analyze the gene expression profile of PPj using jejunal mesenteric lymph nodes as a reference sample. Jejunal Peyer's patches and MLNj from 6 healthy young pigs among 6 and 7 weeks of age were collected. The total RNA was isolated from samples, RNA from PPj and a pool of the RNA of MLNj from each animal was used to make a microarray probe. From 2.644 genes in the microarray chip, known as the "pork chip," 33 were more expressed in PPj. Most of them are related to the cellular processes and to the cellular metabolism; 6 are unknown genes. Ten genes were over expressed in MLNj with respect to PPj, 3 were related to antigen processing, and 7 are unknown genes. The microarray hybridizations were performed in duplicate with a dye-swap (Cy5 e Cy3). The microarray accuracy was proved by the real time PCR technique; aleatory genes were picked and showed coherence between the techniques.

Utilizing MLNj as a reference sample, the gene expression profile of PPj was found, along with the over expression of genes related to the cellular processes and genes related to the cellular metabolism. The microarray technique was accurate for the gene expression analysis.

INTRODUÇÃO GERAL

Recentes avanços em biologia molecular têm permitido a identificação de vários genes, no entanto, nem todos possuem suas funções e expressões esclarecidas. A tecnologia de microarray permite obter-se um conhecimento do perfil da expressão gênica de células e tecidos, assim como informações moleculares (Kurella, Hsiao et al. 2001). Processos moleculares estabelecidos pelo microarray não são aplicados apenas a estímulos específicos ou a determinada patologia, outros eventos também podem ser analisados, como por exemplo, o perfil da expressão gênica durante o crescimento ou até mesmo o perfil da expressão gênica normal de determinados órgãos e tecidos (Hilary, Grandori et al. 2000).

O sistema imune poderia ser visto como um órgão distribuído pelo corpo oferecendo defesa ao hospedeiro contra patógenos. Dentro do sistema imune, existem compartimentos diferenciados anatomicamente, cada um especialmente adaptado para ativar resposta imunológica a patógenos presentes no organismo. O sistema imune das mucosas constitui a primeira linha de defesa contra uma grande variedade de patógenos. As mucosas são finas camadas constituindo barreiras permeáveis devido às suas atividades fisiológicas como troca gasosa, absorção de alimentos, atividades sensoriais e reprodução. A necessidade de permeabilidade das mucosas faz com que estas sejam vulneráveis a infecções e portanto, a via de acesso da maioria dos agentes infecciosos. A mucosa do trato gastrointestinal age como entrada de uma variedade de antígenos em forma de alimento. O sistema imune possui um mecanismo para evitar a resposta imune contra os alimentos e também para detectar e destruir organismos patogênicos (Janeway C. A. 2001). A mucosa gastrointestinal é colonizada por aproximadamente 10^{14} microorganismos comensais, que vivem em simbiose com o seu hospedeiro. Essa microflora simbiótica é benéfica ao hospedeiro em relação ao processamento de alimentos, oferecendo resistência à colonização de bactérias patogênicas, além de auxiliar na síntese de vitamina K e de outras

vitaminas do complexo B (Savage 1977; Hooper, Bry et al. 1998; Hecht 1999; Janeway C. A. 2001).

O padrão de expressão gênica dos tecidos linfóides associados ao intestino, conhecidos como GALT, tem sido investigado com o objetivo de facilitar a compreensão de como a resposta imunológica no intestino é desenvolvida, já que a ativação e a regulação da resposta imune é considerada complexa (Tatlow, Brownlie et al. 2000).

O intestino contém a maior quantidade de tecidos linfóides do organismo, os quais consistem de regiões organizadas de tecido linfóide composto por placas de Peyer (PPs), linfonodos do mesentério (MLNs) e uma grande quantidade de células linfóides espalhadas pela lâmina própria e pelo epitélio intestinal (Mowat and Viney 1997).

Um relevante avanço relacionado ao sistema imunológico pode ser descoberto pela investigação de genes expressos em diferentes tecidos responsáveis pela ativação da resposta imunológica. A necessidade de animais livres de doenças e com um sistema imunológico competente na realização de experimentos fez com que suínos jovens (leitões) e saudáveis fossem utilizados para o presente estudo. Perfis de expressão gênica têm sido relatados em várias espécies, tecidos e células (DeRisi, Penland et al. 1996; Khan, Simon et al. 1998; Welford, Gregg et al. 1998; Bortoluzzi, d'Alessi et al. 2000; Tatlow, Brownlie et al. 2000; Bortoluzzi, d'Alessi et al. 2001; Hsiao, Dangond et al. 2001). No entanto, até o presente momento, não existem estudos relatados, investigando pela tecnologia de microarray, a expressão gênica de PPs em suínos. Neste estudo foi utilizado o "pork chip" desenvolvido pelo laboratório de biologia molecular do departamento de ciências veterinárias e biomédicas da Universidade de Minnesota – EUA, usando PP jejunais estimuladas. Além disso, o "pork chip" deve conter a maioria dos genes envolvidos na resposta imunológica intestinal. Um pool de RNA foi utilizado como referência, amostra obtida de MLNs jejunais de leitões saudáveis.

O laboratório de biologia molecular do departamento de ciências veterinárias e biomédicas da Universidade de Minnesota possui, entre outros, o

interesse de analisar as alterações gênicas que ocorrem em placas de Peyer de suínos, quando esses são infectados com microorganismos, como por exemplo, a *Salmonella choleraesuis*. Daí vem a importância deste estudo, a de conhecer primeiramente a biologia das placas de Peyer em animais saudáveis, ou seja, o padrão de expressão gênica deste órgão para posteriormente compará-la com a expressão gênica de placas de Peyer infectadas.

Para a medicina veterinária, além da importância das pesquisas realizadas em suínos, estes têm sido utilizados como animais modelo para pesquisas relacionadas a humanos e contribuído grandemente para a melhor compreensão dos processos fisiológicos e patofisiológicos relacionados, entre outros, às glândulas endócrinas, órgãos linfóides, músculos, sistema nervoso central e periférico, trato genitourinário e gastrointestinal. Além disso, os suínos tem o potencial para serem doadores de órgãos para xenotransplantes em humanos, devido à similaridade de alguns órgãos do sistema imunológico, à acessibilidade aos animais e ao baixo risco de zoonoses (Brown and Terris 1996; Tumbleson and Schook 1996).

Placas de Peyer

As placas de Peyer são discretas áreas ovais de tecidos linfóides organizados, com aproximadamente 15-20 cm, contendo áreas definidas de linfócitos B e T (figura 1 e 2) e estão localizadas na lâmina própria da mucosa do intestino delgado, proeminentes para o lúmen onde ocorre a indução da resposta imune inata e adquirida (Calich V.; Junqueira L. C. 1995; Mowat and Viney 1997). A principal função das PPs é a produção de imunoglobulinas A (IgA) para o intestino (Burkitt, Young et al. 1993). A resposta imune nas placas de Peyer é ativada através da captura de antígenos por células epiteliais especializadas chamadas células M, os linfócitos formam um folículo grande e central constituído de linfócitos B e um pequeno folículo é formado por linfócitos T (Janeway C. A. 2001). Em suínos existem dois tipos de PPs: do jejuno e do íleo. Aproximadamente 25-35 pequenas PPs são encontradas no jejuno, e no

íleo a PP é contínua (Binns and Licence 1985; Pabst, Geist et al. 1988; Rothkotter, Geist et al. 1988; Stokes, Bailey et al. 1994; Stokes, Haverson et al. 1996).

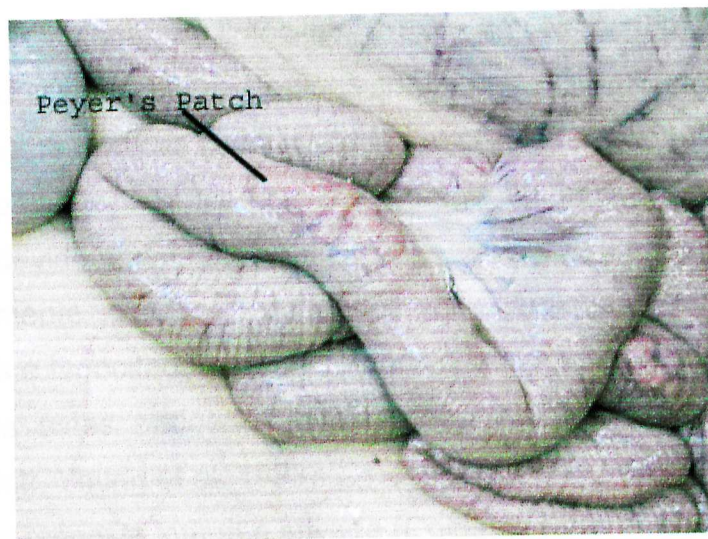


Figura 1 - Visão macroscópica de uma Placa de Peyer (PP) jejunal de suíno (Severidt, Madden et al. 2002).

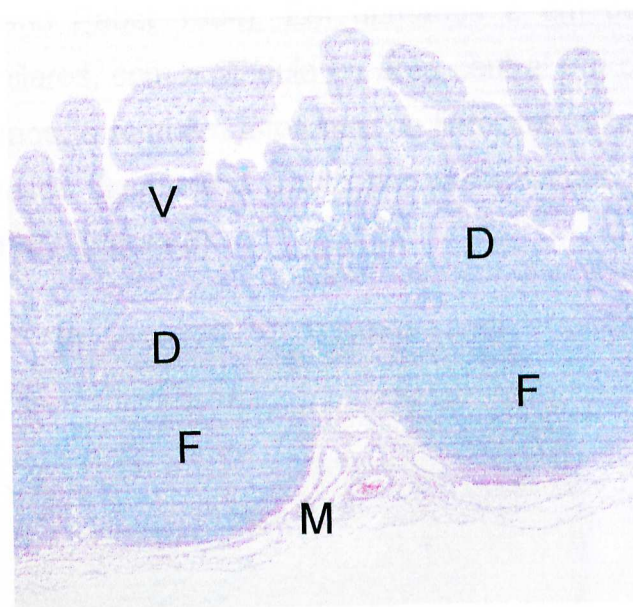


Figura 2 - Organização da placa de Peyer (PP) jejunal. PP jejunal de suíno mostrando folículo isolado (F) e uma fina camada muscular (Sallenave, J et al.). O folículo é coberto pela região denominada dome (D) consistida de células M. (V) vilos (Kulkarni-Narla and Brown 2000).

Linfonodos

Linfonodos (LNs) são estruturas altamente organizadas encapsuladas consistindo-se, na maioria, de linfócitos. Grupos de LNs podem ser encontrados ao longo dos vasos linfáticos, em regiões como: pescoço, axilas, virilha, intestino, pulmão e áreas pára-aórticas (Burkitt, Young et al. 1993).

As principais funções dos LNs são: agregação, ativação e proliferação de linfócitos T e B devido a estímulos antigênicos; produção de células plasmáticas, e conseqüentemente, produção de anticorpos. Qualquer partícula antigênica presente na linfa é fagocitada por macrófagos e células dendríticas, com objetivo de prevenir que estes antígenos e microorganismos alcancem a circulação sangüínea (Burkitt, Young et al. 1993). Os antígenos são transportados para LNs regionais onde a resposta imune é ativada (Goldsby, Kindt et al. 2003).

Em suínos, as áreas dos LNs contendo linfócitos T e B são estruturalmente invertidas; em outras palavras, a medula é periférica, e o córtex é a área central dos LNs (Binns and Pabst 1994). Em humanos e em outras espécies, os linfonodos são similares, com a medula na área central e o córtex periférico. A orientação em suínos, é também diferente; os linfócitos migram dos linfonodos diretamente em vasos sangüíneos e não em vasos linfáticos como em outras espécies (Binns 1982) (figura 3).

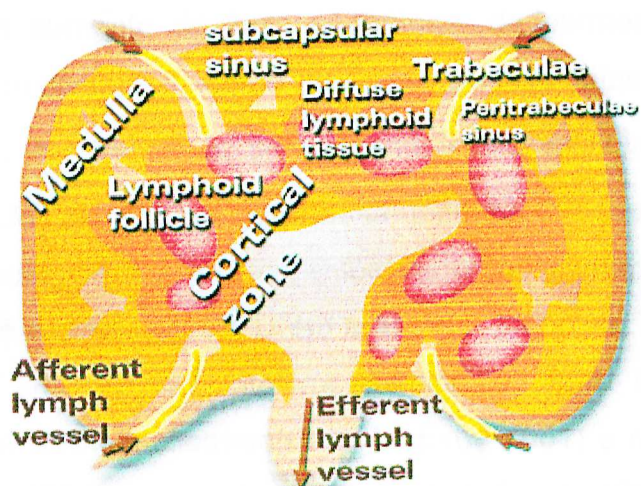


Figura 3 - Organização do linfonodo de suínos, mostrando que a posição da medula e zona cortical são invertidas. (Sanchez-Viscaino 2003)

Resposta Imunológica em placas de Peyer e linfonodos mesentéricos

A resposta imunológica no intestino delgado inicia-se nas PPs, basicamente compostas por enterócitos e células M (figura 4). As células M são responsáveis por fagocitar antígenos do lúmen intestinal e por transportar para a sua superfície basal, onde linfócitos e células apresentadoras de antígenos poderão processá-los (Janeway C. A. 2001).

Células apresentadoras de antígenos, como por exemplo, células dendríticas (CD) expressam altos níveis de MHC classe II. Os linfócitos T naïve, que estão constantemente na circulação sanguínea, acessam os LNs e as PPs extravasando as vênulas endoteliais altas (VEA). Os linfócitos T, quando reconhecem antígenos apresentados pelas CD, rapidamente ativam moléculas de adesão como CD2 (Hahn, Burakoff et al. 1993) e LFA-1 (Dustin and Springer 1989). Esta interação é necessária para a ativação dos linfócitos T e assim, para iniciar a resposta imunológica (Chin, Cai et al. 1990; Kellermann and McEvoy 2001). Os linfócitos T efetores produzem citocinas como $TNF\alpha$, que ativam células endoteliais a expressar E-selectinas, VCAM-1 e ICAM-1; moléculas de VCAM-1 induzem na superfície de células endoteliais o extravasamento de linfócitos T efetores. Além disso, $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$ liberados por linfócitos T efetores, agem sinergicamente mudando a forma das células endoteliais permitindo um aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular, da imigração de leucócitos, fluidos e proteínas para os sítios infecciosos (Janeway C. A. 2001). $IFN-\gamma$ estimula células endoteliais vasculares a promoverem a adesão aos linfócitos. Outras citocinas também estão envolvidas no processo de ativação imunológica em tecidos linfóides, como exemplo, a citocina MIP-3 β (CCL19) que é expressa por CD em áreas de linfócitos T em tecidos linfóides, agindo como uma potente citocina quimiotática para linfócitos T (Warnock, Campbell et al. 2000; Kellermann and McEvoy 2001) e recentemente tem sido observada em VEA promovendo a adesão de linfócitos (Okada, Ngo et al. 2002).

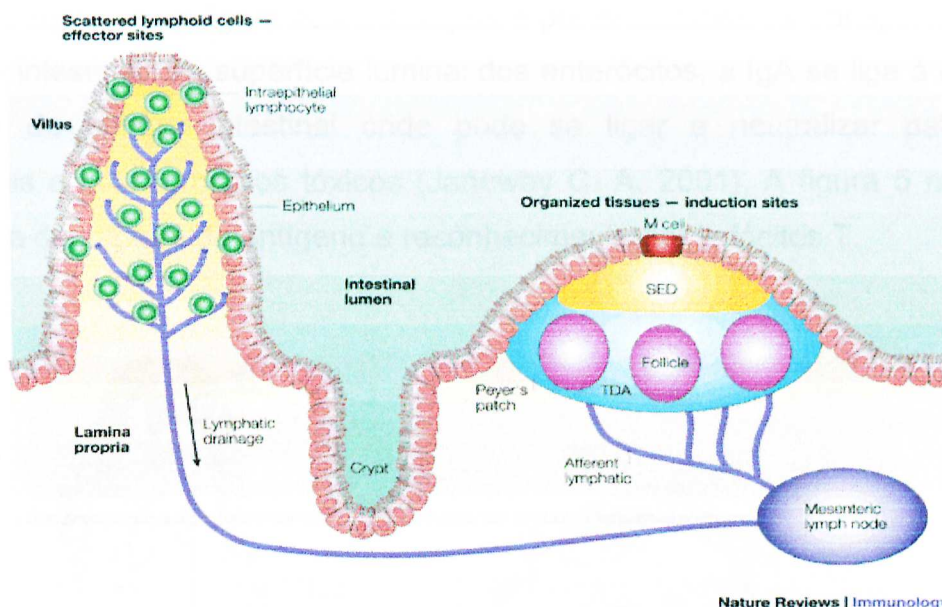


Figura 4 - Representação esquemática de elementos linfóides do sistema imunológico intestinal. O organizado tecido das PPs e dos MLNs está envolvido na indução da imunidade e tolerância, onde os sítios efetores estão espalhados pela lâmina própria e pela mucosa. Ambos, PP e vilos da lâmina própria são drenados por vasos linfáticos aferentes que vão aos MLNs. Dome subepitelial (SED); área timo-dependente (TDA) (Mowat 2003).

Os linfócitos vão das PPs, através dos vasos linfáticos que drenam o intestino, para os LNs mesentéricos onde são ativados (figura 4). Em suínos, como a orientação é diferente, os linfócitos saem dos LNs e caem diretamente em vasos sanguíneos (Binns 1982), circulam pelo corpo e entram nas mucosas através de pequenos vasos sanguíneos que irrigam o intestino e que expressam adressinas como MadCAM-1 (Janeway C. A. 2001).

Além do organizado tecido linfóide, onde a resposta imunológica ocorre, pequenos focos de linfócitos e células plasmáticas são dispersas pela lâmina própria nas paredes intestinais. As células plasmáticas secretam anticorpos; no caso das mucosas, o isotipo predominante é a imunoglobulina A (IgA) (Burkitt, Young et al. 1993; Janeway C. A. 2001), no intestino é encontrado quase que exclusivamente em forma dímica, ligada por uma cadeia J. Os anticorpos são transportadas no intestino por células epiteliais imaturas localizadas nas bases das criptas intestinais. Receptores de IgA presentes na superfície de células

epiteliais imaturas se ligam aos anticorpos e por endocitose os transportam para o lúmen intestinal. Na superfície luminal dos enterócitos, a IgA se liga à camada mucosa do epitélio intestinal onde pode se ligar e neutralizar patógenos intestinais e seus produtos tóxicos (Janeway C. A. 2001). A figura 5 mostra o esquema de captura de antígeno e reconhecimento por linfócitos T.

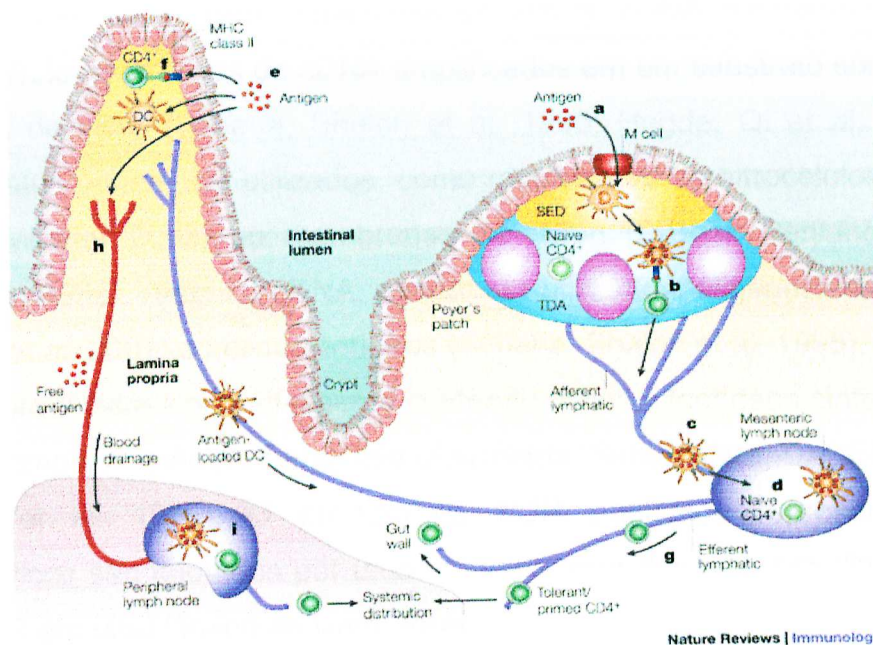


Figura 5 - Captura de antígeno e reconhecimento por linfócitos T do intestino. Os antígenos podem entrar através das células M na PP, (a) são transferidos para as células dendríticas (CDs), e depois apresentados aos linfócitos T nas PP (b). O antígeno capturado pela CD vai da PP para os vasos linfáticos (c), com subsequente reconhecimento do linfócito T nos linfonodos mesentéricos (MLNs) (d). Um similar processo onde o antígeno ou antígeno-célula apresentadora de antígeno (APC) disemina para os MLNs pode ocorrer se o antígeno entrar pelo epitélio que cobre os vilos na lâmina própria (e), mas nesse caso, existe a possibilidade de enterócitos expressando MHC classe II estarem agindo como APCs locais (f). Em todos os casos, o linfócito T CD4 respondendo ao antígeno adquire expressão da $\alpha_4\beta_7$ integrina e do receptor de quimiocina CCR9, deixa o MLN pelo vaso linfático aferente (g) e depois entra na corrente sanguínea e chega até a mucosa através de vasos da lâmina própria. Linfócitos T, que reconhecem antígenos primeiramente nos MLN, podem também disseminar-se pela circulação sanguínea através do sistema imunológico periférico. O antígeno pode também alcançar a circulação sanguínea através do intestino (h) e encontrar linfócitos T nos tecidos linfóides periféricos (i) (Mowat 2003).

Microarray

Microarray consiste em uma tecnologia que permite a análise do padrão de expressão de milhares de genes ao mesmo tempo através da análise quantitativa do sinal fluorescente, que representa a abundância relativa de mRNA de duas amostras distintas (Schena, Shalon et al. 1995; Schena, Shalon et al. 1996; Chen 1997; Quackenbush 2002). cDNA microarrays são criados imprimindo fragmentos de cDNA amplificados em um substrato sólido como uma lâmina de vidro (Schena, Shalon et al. 1995; Hegde, Qi et al. 2000), outros substratos podem ser utilizados, como membranas de nitrocelulose (Benes and Muckenthaler 2003) ou membranas de nylon (DeRisi, Penland et al. 1996; Duggan 1999). Além do cDNA, podem ser utilizados, oligonucleotídeos (Kurella, Hsiao et al. 2001) e polinucleotídeos (Schena, Shalon et al. 1995). Existem ainda chips produzidos comercialmente contendo oligonucleotídeos sintetizados, como por exemplo Affymetrix GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) (Lockhart, Dong et al. 1996). O produto da PCR purificado representando genes específicos são spotados por uma máquina, que deposita nanolitros do produto da PCR em uma lâmina de vidro, formando o chip. Além dos genes de interesse, o chip deve conter também, genes considerados controles negativos e controles positivos. As lâminas recebem um tratamento prévio com poly-L-lysine para aumentar a aderência do cDNA às lâminas e após a impressão, os chips são aquecidos para desnaturar o cDNA e irradiação ultravioleta é utilizado para bloquear o chip evitando ligações inespecíficas (Kurella, Hsiao et al. 2001).

Duas amostras distintas de mRNA são utilizadas, estas são reversamente transcritas e marcadas com moléculas fluorescentes diferentes (normalmente Cy5 e Cy3). Os cDNAs marcados, chamados de sonda, são então combinados e hibridizados em um chip. Após a hibridização, o chip é scaneado, com lasers específicos para captar o sinal de cada molécula fluorescente. A imagem é armazenada em um banco de dados que possui informações sobre o chip, como localização e nome de cada gene do chip. As informações são importadas para

programas específicos de análise de microarray onde é possível executar análises das imagens e estatística (Kurella, Hsiao et al. 2001).

Com o objetivo de manter a qualidade dos dados, os programas de análises de microarray realizam passos importantes como a eliminação de plano de fundo (background), a eliminação de spots irregulares e a normalização, contribuindo para diminuir variações sistemáticas entre chips permitindo a comparação entre estes (Murphy 2002; Quackenbush 2002).

A expressão relativa entre as amostras é calculada e utilizada para detectar expressão diferencial de cada gene entre as amostras (Chen 1997; Yang, Chen et al. 2002). A utilização de um pool de RNA como amostra referência vem sendo utilizado porque permite estabelecer uma linha de base de expressão facilitando a normalização e a comparação das expressões entre chips (Yang, Chen et al. 2002).

As intensidades de fluorescência devem ser padronizadas subtraindo-se a fluorescência de fundo (local background) e a razão da intensidade de Cy5: Cy3 deve ser normalizada em cada chip (Clevel 1988; Yang 2001). Linhas de cortes são utilizadas em análises de microarray para diferenciar as expressões gênicas das variações naturais dos dados (Yang, Chen et al. 2002). Os genes usados como controle negativo e os genes "housekeeping" são utilizados para determinar as linhas de corte.

Genes que não possuem mRNA correspondente nas amostras analisadas são usados como controle negativo. A intensidade desses genes é usada para determinar a linha de corte, determinado pela média e pelo desvio padrão da intensidade do Cy5 e do controle (Cy3) (Benes and Muckenthaler 2003).

Genes "housekeeping" que não devem ter uma expressão diferencial entre as amostras, são utilizados como controle positivo (Nadon and Shoemaker 2002). A linha de corte é determinada pela média e pelo desvio padrão da razão da intensidade dos genes "housekeeping".

OBJETIVOS GERAIS

- Verificar o perfil da expressão gênica de placas de Peyer jejunais em leitões saudáveis, em relação aos linfonodos mesentéricos jejunais.
- Determinar genes que são super expressos nas placas de Peyer em relação aos linfonodos mesentéricos jejunais.
- Determinar genes que são super expressos nos linfonodos mesentéricos jejunais em relação às placas de Peyer.
- Determinar genes que possuem um nível de expressão variável entre os diferentes animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benes, V. and M. Muckenthaler (2003). "Standardization of protocols in cDNA microarray analysis." Trends Biochem Sci **28**(5): 244-9.
- Binns, R. M. (1982). "Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig." Vet. Immunol. Immunopathol. **3**(1-2): 95-146.
- Binns, R. M. and S. T. Licence (1985). "Patterns of migration of labelled blood lymphocyte subpopulations: evidence for two types of Peyer's patch in the young pig." Adv. Exp. Med. Biol. **186**: 661-8.
- Binns, R. M. and R. Pabst (1994). "Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig." Vet. Immunol. Immunopathol. **43**(1-3): 79-87.
- Bortoluzzi, S., F. d'Alessi, et al. (2000). "The human adult skeletal muscle transcriptional profile reconstructed by a novel computational approach." Genome Res **10**(3): 344-9.
- Bortoluzzi, S., F. d'Alessi, et al. (2001). "Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues." Bioinformatics **17**(12): 1152-7.
- Brown, D. R. and J. M. Terris (1996). Advances in Swine in Biomedical Research. New York, Plenum Press.
- Burkitt, H. G., B. Young, et al. (1993). Functional histology. A text and colours atlas. London, Churchill Livingstone.
- Calich V., V. C. Imunologia.
- Chen, Y., Dougherty, E.R., Bittner, M.L. (1997). "Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray images." Journal of Biomedical Optics **2**(4): 364-374.
- Chin, Y. H., J. Cai, et al. (1990). "Lymphocyte adhesion to cultured Peyer's patch high endothelial venule cells is mediated by organ-specific homing receptors and can be regulated by cytokines." J Immunol **145**(11): 3669-77.
- Cleveland, W. S., S. J. Devlin (1988). "Locally-Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting." J.A.S.A. **83**: 596-610.
- DeRisi, J., L. Penland, et al. (1996). "Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer." Nat Genet **14**(4): 457-60.
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, , Trent, J.M. (1999). "Expression profile using cDNA microarrays." Nat. Genet. **21**: 10-14.
- Dustin, M. L. and T. A. Springer (1989). "T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1." Nature **341**(6243): 619-24.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, et al. (2003). Immunology. New York, Freeman.
- Hahn, W. C., S. J. Burakoff, et al. (1993). "Signal transduction pathways involved in T cell receptor-induced regulation of CD2 avidity for CD58." J Immunol **150**(7): 2607-19.
- Hecht, G. (1999). "Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine." Am J Physiol **277**(3 Pt 1): C351-8.
- Hegde, R. Qi, et al. (2000). "A concise guide to cDNA microarray analysis." Biotechniques **29**(3): 548-50, 552-4, 556 passim.

- Hilary, A. C., C. Grandori, et al. (2000). "Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(7): 3260-3265.
- Hooper, L. V., L. Bry, et al. (1998). "Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem." *Bioessays* **20**(4): 336-43.
- Hsiao, L. L., F. Dangond, et al. (2001). "A compendium of gene expression in normal human tissues." *Physiol. Genomics* **7**(2): 97-104.
- Janeway C. A., T. P., Walport M., Shlomchik M. J. (2001). *Immunobiology*. New York, Garland.
- Junqueira L. C., C. J., Kelly R. O. (1995). *Histologia Básica*. Norwalk, CT, Appleton and Lange.
- Kellermann, S. A. and L. M. McEvoy (2001). "The Peyer's patch microenvironment suppresses T cell responses to chemokines and other stimuli." *J Immunol* **167**(2): 682-90.
- Khan, J., R. Simon, et al. (1998). "Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays." *Cancer Res* **58**(22): 5009-13.
- Kulkarni-Narla, A. and D. R. Brown (2000). "Localization of CB1-cannabinoid receptor immunoreactive in the porcine enteric nervous system." *Cell Tissue Res* **302**: 73-80.
- Kurella, M., L. L. Hsiao, et al. (2001). "DNA microarray analysis of complex biologic processes." *J Am Soc Nephrol* **12**(5): 1072-8.
- Lockhart, D. J., H. Dong, et al. (1996). "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays." *Nat Biotechnol* **14**: 1675-1680.
- Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." *Nat Rev Immunol* **3**(4): 331-41.
- Mowat, A. M. and J. L. Viney (1997). "The anatomical basis of intestinal immunity." *Immunol. Rev.* **156**: 145-66.
- Murphy, D. (2002). "Genes expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects." *Advances in Physiology Education* **26**(4): 256-270.
- Nadon, R. and J. Shoemaker (2002). "Statistical issues with microarrays: processing and analysis." *Trends Genet* **18**(5): 265-71.
- Okada, T., V. N. Ngo, et al. (2002). "Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches." *J Exp Med* **196**(1): 65-75.
- Pabst, R., M. Geist, et al. (1988). "Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs." *Immunology* **64**(3): 539-44.
- Quackenbush, J. (2002). "Microarray data normalization and transformation." *Nature Genetics supplement* **32**.
- Rothkotter, H. J., M. Geist, et al. (1988). "Age-dependence of lymphocyte production in Peyer's patch follicles in contrast to the other Peyer's patch compartments and the thymus." *Adv. Exp. Med. Biol.* **237**: 81-5.
- Sallenave, J. M., S. J., et al. (1994). "Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes." *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**: 733-741.

- Sanchez-Viscaino, J. M. (2003). Lymph node. Course of Introduction to the Swine Immunology http://www.hipra.com/CURSOINM_ING/welcome1.htm.
- Savage, D. C. (1977). "Microbial ecology of the gastrointestinal tract." Annu Rev Microbiol **31**: 107-33.
- Schena, M., D. Shalon, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." Science **270**: 467-470.
- Schena, M., D. Shalon, et al. (1996). "Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**(20): 10614-9.
- Severidt, J. A., D. J. Madden, et al. (2002). Peyer's patch. Dairy Cattle Necropsy Manual <http://www.cvmb.colostate.edu/ilm/necropsy/notes/necropsy15.html>.
- Stokes, C. R., M. Bailey, et al. (1994). "Immunology of the porcine gastrointestinal tract." Vet. Immunol. Immunopathol. **43**(1-3): 143-50.
- Stokes, C. R., K. Haverson, et al. (1996). "Antigen presenting cells in the porcine gut." Vet. Immunol. Immunopathol. **54**(1-4): 171-7.
- Tatlow, D., R. Brownlie, et al. (2000). "Differential display analysis of gene expression during the induction of mucosal immunity." Immunogenetics **52**(1-2): 73-80.
- Tumbleson, M. E. and L. B. Schook (1996). Advances in swine in biomedical research. New York, Plenum press.
- Wang, C., R. J. Hawken, et al. (2001). "Generation and mapping of expressed sequence tags from virus-infected swine macrophages." Anim. Biotechnol. **12**(1): 51-67.
- Warnock, R. A., J. J. Campbell, et al. (2000). "The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules." J Exp Med **191**(1): 77-88.
- Welford, S. M., J. Gregg, et al. (1998). "Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization." Nucleic Acids Res **26**(12): 3059-65.
- Yang, I. V., E. Chen, et al. (2002). "Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays." Genome Biol **3**(11): research0062.
- Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, , T. Speed (2001). Normalization for cDNA Microarray Data. San Hose, CA.

CAPÍTULO ÚNICO

*Expressão Gênica Diferencial de Placas de Peyer jejunais
em relação a Linfonodos Mesentéricos Jejunais de Leitões*

Resumo

Expressão Gênica Diferencial de Placas de Peyer Jejunaes em relação a Linfonodos Mesentéricos Jejunaes de Leitões

Introdução: Genes relacionados ao mecanismo de defesa do intestino apresentaram uma expressão aumentada em placas de Peyer jejunaes (PPj) de leitões saudáveis. No presente estudo, a tecnologia de microarray foi utilizada com o objetivo de analisar o perfil da expressão gênica de PPj em relação aos linfonodos mesentéricos jejunaes (MLNj).

Métodos e Resultados: Placas de Peyer jejunaes e MLNj foram coletados de 6 leitões saudáveis e utilizados para construir sondas de microarray. O "pork chip" para microarray desenvolvido no laboratório de biologia molecular do departamento de ciências veterinárias e biomédicas da Universidade de Minnesota – EUA, construído com genes presentes em PPj estimuladas foi utilizado. Foi analisado o diferencial de expressão gênica de PPj em relação aos MLNj, onde um pool de RNA de MLNj dos 6 leitões foi utilizado como referência. Trinta e três genes foram considerados mais expressos em PPj em relação aos MLNj; a maioria destes apresentou uma função relacionada à processos celulares e ao metabolismo celular normal; sendo que em 6 genes ainda não se conhecem as funções. Dez genes mostraram mais expressão em MLNj em relação à PPj, 3 relacionados ao processamento de antígenos e 7 com funções desconhecidas. A precisão do microarray foi verificada utilizando-se a técnica de PCR em tempo real, genes aleatórios foram escolhidos e estes mostraram uma expressão coerente entre as técnicas.

Conclusão: Utilizando MLNj como referência para analisar o perfil da expressão gênica de PPj encontrou-se, uma expressão aumentada de genes relacionados ao mecanismo de defesa do intestino e genes relacionados ao metabolismo celular. A tecnologia de microarray mostrou-se precisa para a análise de expressões gênicas.

Abstract

Gene Expression Profile of Jejunal Peyer's patches and Jejunal Mesenteric Lymph Nodes in Young pigs

Background: Genes with respect to the gut defense appeared to be more expressed in the Peyer's patches (PPj) of healthy young pigs. In this study, the cDNA microarray technique was utilized to analyze the gene expression profile of PPj using jejunal mesenteric lymph nodes as a reference sample.

Methods and Results: Jejunal Peyer's patches and MLNj from 6 healthy young pigs among 6 and 7 weeks of age were collected, and were used to make a microarray probe. The "pork chip" microarray was developed with genes from stimulated PPj by molecular biology lab, veterinary pathobiology department of University of Minnesota – EUA. Gene expression profile of PPj was analyzed related to MLNj, which a pool of RNA of MLN was used as a reference sample. Thirty-three genes were more expressed in PPj. Most of them are related to the cellular processes and to the cellular metabolism; 6 are unknown genes. Ten genes were over expressed in MLNj with respect to PPj, 3 were related to antigen processing and 7 are unknown genes. The microarray hybridizations were performed in duplicate with a dye-swap (Cy5 e Cy3). The microarray accuracy was proved by the real time PCR technique; aleatory genes were picked and showed coherence between the techniques.

Conclusion: Utilizing MLNj as a reference sample, the gene expression profile of PPj was found, along with the over expression of genes related to the cellular processes and genes related to the cellular metabolism. The microarray technique was accurate for the gene expression analysis.

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal é uma vasta área de superfície, uma média de 300 m² em humanos, é colonizado por mais de 400 espécies de bactérias comensais, alcançando a 10¹¹ organismos/ml de fluido luminal (Savage 1977; Hooper, Bry et al. 1998). Essa simbiótica microflora permite assistência ao hospedeiro em relação ao processamento de nutrientes e à colonização resistente contra patógenos exógenos ou bactérias oportunistas presentes na flora intestinal (van der Waaij 1989). O intestino está envolvido em um mecanismo protetor, uma vez que bactérias patogênicas podem existir na flora intestinal sem causar nenhum dano ao hospedeiro (Hecht 1999).

O epitélio intestinal funciona como uma barreira para a entrada de patógenos. As duas principais funções da mucosa intestinal são absorção de nutrientes e barreira microbiana; ambas criam um conflito em suas funções, necessitando de um complexo sistema físico, bioquímico e mecanismos celulares para a proteção da mucosa intestinal contra patógenos invasores. Assim, o epitélio do intestino delgado é especializado nas funções absorcivas e secretórias. A borda luminal das células absorcivas consiste de microvilos, aumentando a superfície de absorção do epitélio. Células Goblet secretam muco, protegendo o epitélio de patógenos (Sanderson and Walker 1994). A lisozima secretada por células de Paneth nas criptas e peptídeos ricos em prolina são fatores antibacterianos presentes no intestino (Sanderson and Walker 1994; Junqueira L. C. 1995; Agerberth, Gunne et al. 1996; Korthuis, Gute et al. 1999; Zhang, Ross et al. 2000). Um compartimento imunológico altamente organizado, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), intimamente ligado ao epitélio intestinal, consiste de uma grande massa de células imunológicas no organismo e confere uma específica defesa ao hospedeiro (Mowat and Viney 1997).

A função do GALT é a apresentação de antígenos a linfócitos e inclui as placas de Peyer do intestino delgado. As PPs são encontradas em uma região de epitélio especializado, o folículo associado ao epitélio. Junto às células

epiteliais estão as células M, são as únicas células epiteliais que fagocitam e processam antígenos luminais para subsequente exposição a linfócitos T e B. Na superfície basal das células M estão as células apresentadoras de antígenos, que capturam os antígenos, migram para os linfonodos mesentéricos onde ocorre a ativação dos linfócitos T e B (Neutra 1998).

A importância de elucidar a resposta celular e molecular no intestino delgado é crucial na determinação de como ocorrem infecções entéricas. Essa linha de investigação seguida pelo laboratório de biologia molecular do departamento de ciências veterinárias e biomédicas da Universidade de Minnesota – EUA levou ao desenvolvimento deste estudo, onde o perfil da expressão gênica de PPj de leitões saudáveis foi analisado pela tecnologia de microarray, utilizando-se como amostra referência um pool de RNA de MLNj de leitões saudáveis. A técnica de PCR em tempo real também foi utilizada para confirmar a viabilidade dos dados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupo de Estudo

O estudo constou de amostras obtidas de suínos mantidos em isolamento na Universidade de Minnesota (U of MN). Todas as análises foram realizadas no laboratório de biologia molecular do departamento de ciências veterinárias e biomédicas da Universidade de Minnesota (U of MN) sob a orientação do Dr. Michael Murtaugh.

Foram incluídos na pesquisa 6 leitões, resultado do cruzamento das raças Yorkshire e Landrace, sendo 3 machos e 3 fêmeas (6-7 semanas de idade, ~ 16 kg). Os leitões foram provenientes de uma fazenda regularmente testada para o vírus da influenza suína (H1N1 and H3N3), vírus da síndrome respiratória e reprodutiva de suínos, *Mycoplasma hyopneumoniae*, vírus da pseudorraiva suína, vírus da gastroenterite transmissível e parvovírus. Os animais foram mantidos em isolamento (U of MN) durante 2 semanas antes do sacrifício, com acesso contínuo à água e à ração de suínos sem medicamentos. Jejum não foi aplicado antes do sacrifício e os animais foram mantidos sob cuidado veterinário.

Os leitões foram anestesiados com tiletamina hidrócloride-zolazepam (Telazol[®]; 8 mg/kg; Laboratório Fort Dodge, Inc., Fort Dodge, IA, EUA) em combinação com xilazina via intramuscular. A eutanásia foi realizada em seguida com Beuthanasia[®]-D Special (0.5 ml/kg; Schering-Plough Saúde Animal, Union, NJ, EUA) intravenosa, de acordo com o protocolo aprovado pelo IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) da Universidade de Minnesota.

Material Biológico

O material biológico utilizado constituiu-se de segmentos do jejuno contendo placas de Peyer e linfonodos mesentéricos do jejuno removidos do

animal até 10 minutos após a eutanásia. As amostras foram mantidas em PBS gelado. Segmentos intestinais foram incisados longitudinalmente pela borda mesentérica e a camada muscular foi removida. Pequenos pedaços (0,5 cm de espessura) da placa de Peyer (PPj), e linfonodos mesentéricos jejunais (MLNj) foram mantidos em RNAlater (Ambion, Austin, TX, EUA) a 4°C overnight; as amostras foram então transferidas para -80°C até o procedimento de extração de RNA.

Extração de RNA

As extrações de RNA total foram feitas usando o kit RNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA) seguindo o protocolo de isolamento de RNA de tecidos. Os tecidos foram homogenizados com o auxílio de um homogenizador (Polytron). A qualidade do RNA foi verificada usando-se Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Carmel, IN, EUA) (figura 6) pela média de RNAs 28S / 18S e uma boa qualidade foi considerada entre os valores de 1 e 2. RNAs com médias abaixo de 1 foram excluídos e a extração repetida. Os RNAs foram precipitados e a quantidade foi determinada por espectrofotômetro a 260nm; os RNAs foram mantidos a -80°C.

Todos os cuidados para evitar contaminação tanto cruzada de animal para animal como de outros materiais vindos do meio foram tomados.

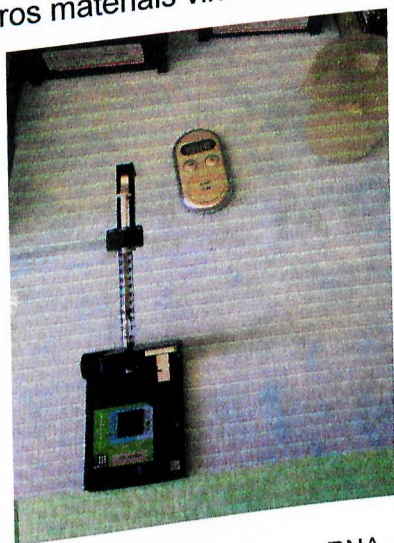


Figura 6 - Agilent chip. Chip utilizado para análise de RNA.

Construção do chip de microarray

O "pork chip" para microarray foi construído com 2.644 clones provenientes de uma biblioteca de cDNA de placas de Peyer jejunais (PPj). As PPj foram tratadas com vários estímulos imunológicos (*Salmonella* serovar Choleraesuis, cêpa SC-54, LPS, toxina da cólera, acetato miristato de forbol, 8-bromo-cAMP e concanavalina A, todos com a presença ou ausência de cicloheximide) utilizando-se o "Ussing chamber". RNA foi extraído de cada tecido e usado para construir uma biblioteca normal e outra estimulada. Essas bibliotecas foram combinadas e subtraídas de RNA extraído de fibroblastos de células tronco de suínos, para eliminar genes envolvidos no ciclo celular. Seqüências da biblioteca subtraída foram alinhadas em "contigs" usando-se o software phred/phrap/consed (www.phrap.org). Além disso, um grupo UniGene foi criado pela seleção de um clone para cada contig. Cada array contém 88 ESTs (expression sequence tags) identificadas por diferencial display RT-PCR (Zhang, Shin et al. 1999; Wang, Hawken et al. 2001), 42 genes clonados pelo laboratório de biologia molecular do departamento de ciências veterinárias e biomédicas da Universidade de Minnesota - EUA sob supervisão de Dr. Michael Murtaugh, 8 genes como controles negativos, 9 genes como controles positivos, e 2 vetores como controles negativos.

Os plasmídios inseridos foram amplificados 2 vezes pela técnica de nested PCR (reação em cadeia de polimerase) usando-se primers específicos para os vetores. Os produtos para a segunda amplificação da PCR foram purificados pelo kit "Montage PCR 96" (Millipore, Billerica, MA, EUA) e submetidos à eletroforese em gel de agarose (0.8%) para quantificar o DNA pela comparação de corridas padrões em cada gel. Os produtos da PCR foram secos e ressuspendidos em 1X tampão de spotagem à base de fosfato (fosfato de sódio 150 mM e EDTA 1mM (pH 8.5)) com uma concentração final de 100-300 ng/ul e transferidos para placas de 384 poços. Os produtos da PCR foram impressos, em quadruplicata, em lâminas de vidro revestidos com poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (Eisen and Brown 1999) usando a BioRobotics

MicroGrid II (BioRobotics Ltd., Haslingfield, Cambridge, UK) com pente de 48 pinos. Os poços foram impressos com uma distância de 0,22 μm entre eles e arranjados separadamente em 48 subarrays de 16 X 16 poços, em um total de 12.288 poços por lâmina de microarray. As lâminas foram aquecidas por 15 min a 80°C, irradiadas com UV (65 mJ), quimicamente bloqueadas com 1-metil-2-pyrrolidinone e anidrida succinica (Schena, Shalon et al. 1996) e estocadas à temperatura ambiente a vácuo. A qualidade das lâminas impressas foi verificada com SYBR Gold (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) utilizando-se uma lâmina aleatória e scaneado a 488/530 nm (Excitation/ Emission) (Battaglia, Salani et al. 2000).

Preparação da sonda de microarray

A sonda de microarray foi preparada utilizando-se o kit "Super Script Indirect cDNA Labeling System" (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O RNA dos MLNj dos 6 leitões foi combinado e utilizado como amostra referência. A quantia de 7 μg de RNA total foi reversamente transcrita na presença de aminoalil- nucleotídeo modificado, aminohexil- nucleotídeo modificado e com primers oligo dT ancorado. O cDNA foi acoplado a moléculas fluorescentes Cy3 e Cy5 (CyDye™ Post-Labeling Reactive Dye Packs, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA); depois, as moléculas fluorescentes foram invertidas utilizando as mesmas amostras (dye-swap) (figura 7). O grupo NHS reage com o grupo amino livre do aminoalil- nucleotídeo modificado e do aminohexil- nucleotídeo modificado. Depois da purificação do cDNA ligado às moléculas fluorescentes Cy3 e Cy5, o tampão de hibridização foi adicionado uma concentração final de 3.3X SSC (tampão de citrato de sódio), 1.6 mg/ml Poli A e 0.3% SDS (duodecil sulfato sódico) em um volume final de 70 μl (Eisen and Brown 1999), aquecido a 100°C por 2 min. e resfriado à temperatura ambiente durante 5-10 min.

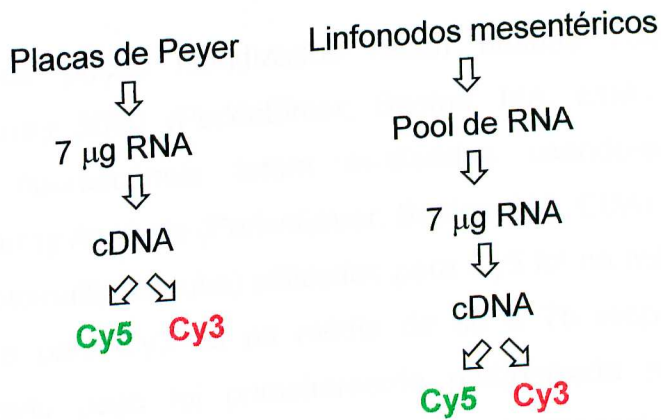


Figura 7 - Esquema de preparação das sondas de cDNA.

Hibridização e Análise dos Dados

Uma lamínula (LifterSlip; Erie Scientific, Portsmouth, NH, EUA) foi colocada sobre o chip de microarray, e as sondas ligadas às moléculas Cy3 e Cy5 foram combinadas e inseridas entre o chip e a lamínula, lacradas em cassetes de hibridização e hibridizadas aos DNAs alvos de 5 a 16 horas em banho-maria a 63°C. A figura 8 mostra o designer do experimento. Após a hibridização os chips foram lavados com 2 soluções de lavagem. A primeira solução de lavagem era composta por 0,56XSSC e 0,028% de SDS, o chip era agitado nesta solução por 1 minuto e depois deixado mais 4 minutos na solução, na ausência de luz. A segunda solução de lavagem era composta por 0,056x SSC seguindo o mesmo procedimento da primeira lavagem. O chip era então centrifugado a 600 rpm durante 5 minutos e scaneado.

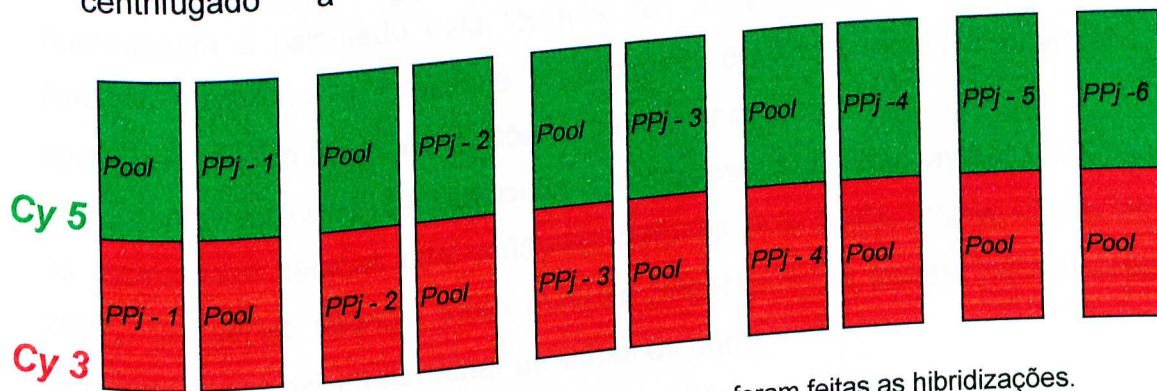


Figura 8 – Designer do experimento, mostrando como foram feitas as hibridizações.

Imagens dos poços hibridizados foram obtidas com scanner de microarray ScanArray 5000 (PerkinElmer, Boston, MA, EUA) (figura 9). As intensidades de fluorescência foram analisadas usando-se o software QuantArray Microarray Analysis (PerkinElmer, Boston, MA, EUA). Os valores de power e PMT (photomultiplier tube) utilizados para Cy5 foi na média de 80 e 70 respectivamente, e para Cy3 foi na média de 90 e 75 respectivamente. A intensidade de cada poço foi primeiramente padronizada subtraindo-se a fluorescência de fundo (local background) e a razão da intensidade de Cy5: Cy3 foi normalizada em cada chip pelo software LOWESS (intensity dependent normalization) (Cleveland 1988; Yang 2001). Poços com razão de intensidade em dobro ou mais foram analisados quanto à diferença de expressão. O programa de análises de microarray GeneSpring 6.1 (Silicon Genetics, Redwood, CA, EUA) foi utilizado nas análises estatísticas e na visualização das expressões.

A qualidade dos spots do microarray é um importante parâmetro para determinar a acurácia e a reprodutibilidade dos dados de microarray. Os índices de tolerância foram determinados pelas médias de 2 chips hibridizados e a média, mais ou menos 2 vezes o desvio padrão de cada parâmetro foi calculada: diâmetro: 144-233 μm ; área: 8958-34076 μm^2 ; circularidade: 0.82 μm (mínimo); uniformidade do spot: 0.75 (mínimo); uniformidade do plano de fundo (background): 0.97 (mínimo); razão do sinal / background: 25. Um limite de confiança para cada parâmetro foi calculado pelo QuantArray baseado no índice de tolerância de cada parâmetro. O valor do limite de confiança para cada fluoresceína é calculado pela fórmula: $(c_1 \times c_2 \times \dots \times c_n)^{1/n}$. Os spots foram filtrados baseados na presença ou ausência de flags, sendo descartados os spots que tiveram um limite de confiança menor do que 0.7.

Linhas de cortes são utilizadas em análises de microarray para diferenciar as expressões gênicas das variações naturais dos dados (Yang, Chen et al. 2002). Os genes usados como controle negativo e os genes "housekeeping" foram utilizados para determinar as linhas de corte.

Os genes que não possuem mRNA correspondente nas amostras analisadas foram usados como controle negativo (tabela 1). A intensidade desses genes foi usada para determinar a linha de corte, determinado pela média e pelo desvio padrão da intensidade do Cy5 e do controle (Cy3) separadamente. As amostras foram consideradas detectadas e expressas se a intensidade do sinal excedeu a média mais 2 vezes o desvio padrão da intensidade dos controles negativos (Benes and Muckenthaler 2003).

Genes "housekeeping" que não devem ter uma expressão diferencial entre as amostras, foram utilizados como controle positivo (tabela 1) (Nadon and Shoemaker 2002). A linha de corte foi determinada pela média e pelo desvio padrão da razão entre os genes "housekeeping", calculando-se a média mais ou menos duas vezes o desvio padrão. Genes que tiveram alto ou baixo nível de expressão foram determinados baseados nesses valores.

Tabela 1 - Genes utilizados como controle negativo e genes "housekeeping" para a realização das linhas de corte.

Genes controle negativo	Genes "Housekeeping"
ORF7	TGFbeta 1 Frag_3
ORF6	TGFbeta 1 Frag_2
ORF5	TGF beta 3
ORF4	TGF beta 2
ORF3	PPIB
ORF2	PPID
KAN-R	PPIA
Arab_997277	HPRT
pGEMT (vetor)	GAPDH
pCMVSPORT6 (vetor)	

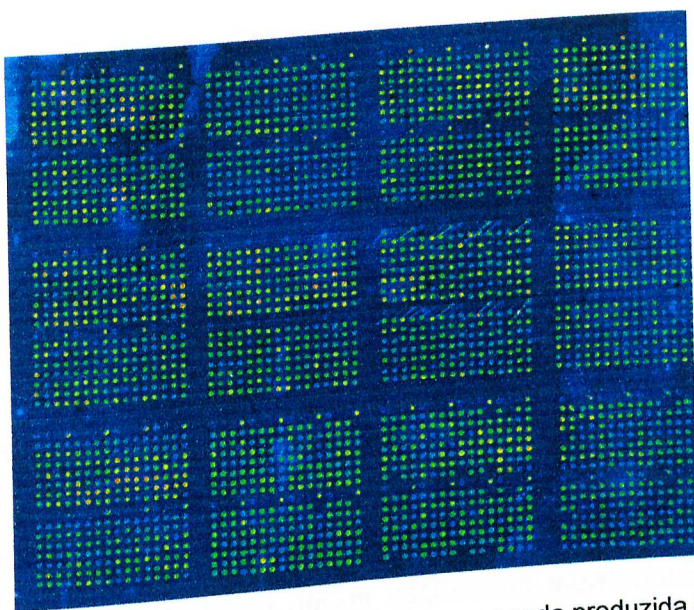


Figura 9 - Imagem parcial do "Pork chip" hibridizado com sonda produzida com PPj e MLNj. O chip é formado por 48 subarrays, de 16 x 16 spots.

Análise Estatística

Utilizou-se o programa GeneSpring 6.1 (Silicon Genetics, Redwood, CA, EUA) para realizar as análises. Em todas elas, foi utilizado o erro α menor que 5% ($p < 0.05$) para o nível de significância.

O teste t com o procedimento de Benjamini e Hochberg (false discovery rate multiple testing corrections) foi utilizado para verificar diferenças entre o níveis relativos de expressão do chip com o nível de expressão de cada gene. O teste t foi realizado após a aplicação das linhas de cortes.

Para a identificação da variação gênica, o coeficiente de variação foi calculado ($CV = \text{desvio padrão}/\text{média}$) com o objetivo de mostrar genes que possuem uma expressão altamente variável entre os diferentes animais.

A correlação da expressão obtida pelo microarray e pelo PCR em tempo real foi calculada utilizando-se $-\Delta Ct$, da PCR em tempo real, relativo ao MLNj; e para o microarray, a razão (PPj/MLNj) normalizadas por logaritmo natural (Ln).

Foi realizada a clusterização dos 33 genes super expressos nas PPj e com os 10 genes super expressos nos MLNj, para cada animal, onde foram clusterizados de acordo com a similaridade de expressão seguindo uma

correlação padrão. Para a árvore de clusterização foi calculada a correlação para cada gene com todos os outros genes de grupo. Os 2 genes com maior correlação foram pareados, calculando a média da expressão. Foi feita, então, a correlação destes com todos os outros genes não pareados. Isto foi repetido até que todos os genes fossem pareados. O software GeneSpring 6.1 (Silicon Genetics, Redwood, CA, EUA) foi utilizado para a realização do cluster.

PCR em Tempo Real

A precisão do microarray foi testada usando a técnica de PCR em tempo real. Para isso, foram utilizados 9 genes escolhidos aleatoriamente, e primers foram desenhados de acordo com as seqüências de cDNA derivadas do banco de dados do GenBank. As seqüências de primers são mostradas na tabela 2. Foram utilizadas amostras de 4 leitões, 2 leitões foram descartados por não ter RNA suficiente para a realização da técnica. A transcrição reversa foi feita utilizando-se 2 µg de RNA total em 20 µl de reação com 50 µM de primers hexâmeros randômicos e 10 µM de dNTP, incubados a 70°C por 10 min.. Em seguida, 4 µl de tampão 5x (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 2 µl de DTT 0.1M, 20 und de inibidor de RNase e 200 und de SuperScript II RNase H transcriptase reversa (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), foi adicionado ao tubo. As amostras foram submetidas ao termociclador sob as seguintes condições: 10 min a 25°C, 2 hrs a 42°C e 15 min a 70°C.

Uma alíquota (1 µl) do produto da transcrição reversa foi diluída em 9 µl de Tris HCl 10 mM e 0.6 µl foi utilizado na reação de PCR em tempo real com primers específicos, previamente descritos.

Valores quantitativos são obtidos através do número de ciclos (valor do Ct - threshold cycle) onde a fluorescência associada ao crescimento exponencial do produto da PCR é detectada pelo laser detector do ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O valor do Ct (threshold cycle) do pool de RNA de MLNj foi utilizado para normalizar a reação. A reação de PCR em tempo real consistiu de 7.5 µl de

SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 100 nM de cada primers em um volume final de 15 μ l. SYBR Green PCR Master Mix é composto pela fluoresceína SYBR green I, polimerase Amplitaq Gold DNA e dNTPs. As amostras foram submetidas ao termociclador para PCR em tempo real ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) sob as seguintes condições: 10 min a 95°C, 50 ciclos de 15 seg. a 95°C e 1 min a 60°C, 15 seg. a 95°C, 20 seg. a 60°C e após 20 min. de pausa, 15 seg. a 95°C.

Para analisar os dados, foi usado um método comparativo utilizando-se Ct. A expressão relativa foi calculada pela seguinte fórmula aritmética: $-\Delta Ct$, onde, ΔCt é o Ct de cada amostra de cada animal subtraído do Ct do pool de RNA de MLNj dos leitões ($\Delta Ct = Ct \text{ (amostra)} - Ct \text{ (pool RNA)}$) (Giulietti, Overbergh et al. 2001).

Tabela 2 - Grupo de primers, seqüência de nucleotídeos dos primers e tamanho do produto de PCR em tempo real.

Porkchip ID	GenBank	Seqüências dos Primers	Tamanho do produto
PPSL_02F10	CB285469	F: 5'-TGTGCCCTTCCCCTCCTGAAAG R: 5'-CTTGGCATGGAACCCACGAGAAT	99 pb
PPSL_12A02	CB285254	F: 5'-GTGGCCACTGCCCTAGGATTCTT R: 5'-CTTCCCGCAAAGCCTTCACAG	116 pb
PPSL_15E07	CB286904	F: 5'-CCTAGGCCGGCCTGATGGTATC R: 5'-TGGGCCACGCAGTCCTTC	120 pb
PPSL_11A12	CB286471	F: 5'-CAGCCTCCTGCCCTTACTCTTTA R: 5'-CCACCCCTCAAACATGAAAATAC	107 pb
PPSL_26G05	CB228227	F: 5'-TAATGGTGCGCAACTAAAGC R: 5'-GGGACAAGCTGAGAAAGTGC	120 pb
PPSL_18H07	CB287260	F: 5'-CATGTAAATGGACTGTGGAAGG R: 5'-GCCACAGACAAAGACAAATCC	147 pb
PPSL_17F11	CB287121	F: 5'-TGGCGCGGTAGCTACAATGGAC R: 5'-GACAAGGAACCCACATGGTCACC	98 pb
PPSL_19H04	CB287372	F: 5'-AGTGCCGACCTGGAGGGTAAGC R: 5'-ACCGCGGGGCCACCATC	123 pb
PPSL_21A07	CB287508	F: 5'-CACCCGCGCCACCTTCT R: 5'-CGCTTAAGACGGCCACCAACC	101 pb

RESULTADOS

Perfil da Expressão Gênica em Leitões

O chip para microarray utilizado neste estudo consiste de 2.644 cDNA clones de placas de Peyer estimuladas com microorganismos. Nestes também incluem-se genes como controles negativos e genes "housekeeping". Um total de 10 hibridizações de microarray, amostras de 6 leitões, foram utilizadas nas análises. Duas hibridizações, dos animais 5 e 6, com as moléculas fluorescentes invertidas não foram utilizadas nas análises. Dos 2.644 genes presentes no chip de microarray, 338 genes foram excluídos baseando-se na qualidade dos spots. Os 2.306 genes restantes foram submetidos à linha de corte com os genes controles negativos, onde 680 genes foram excluídos. Após a linha de corte com os genes "housekeeping", 92 genes foram considerados mais expressos em PPj em relação aos MLNj e 10 genes foram considerados mais expressos em MLNj em relação às PPj. O teste t foi realizado com estes genes; dos 92 genes super expressos em PPj, 33 foram considerados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) e os 10 genes super expressos pelos MLNj foram considerados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) (figura 10).

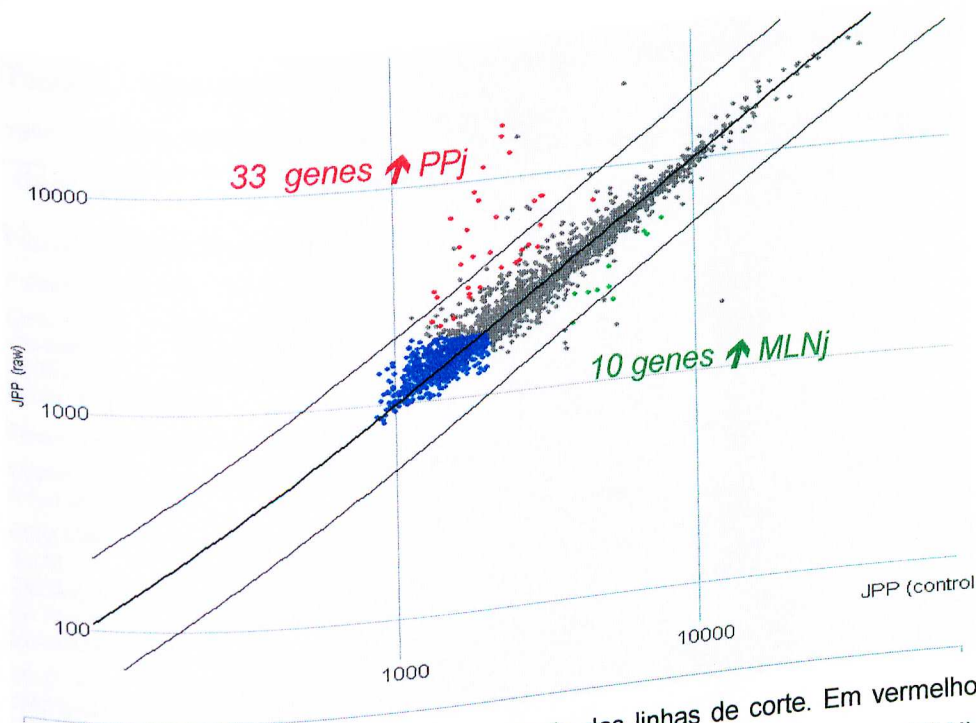


Figura 10 – Scatter plot mostrando o resultado das linhas de corte. Em vermelho estão os 33 genes super expressos nas PPj, em verde os 10 genes super expressos em MLNj e em azul os genes descartados pela linha de corte.

Genes mais expressos em placas de Peyer em relação aos linfonodos mesentéricos jejunais

Dos 2.644 genes presentes no chip de microarray, 33 genes foram mais expressos em PPj em relação aos MLNj e estatisticamente significantes ($p < 0,05$), 6 são genes desconhecidos e 3 foram confirmados pela PCR em tempo real. Estes genes e suas respectivas funções estão evidenciados na tabela 3. Os genes com funções desconhecidas são listados na tabela 4.

Tabela 3 - Genes considerados mais expressos em PPj em relação aos MLNj e seus respectivos valores de *p* e do nível de expressão relativa.

GenBank	Descrição	Valor <i>p</i>	Nível de expressão relativa
Processamento e banco de informações			
	Processamento e armazenamento	3,20E+03	0.804
		0.001	0.746
CB286808	Glutathiona transferase Ω 1	1,74E+02	0.697
CB288003	Glutathiona transferase Ω 1		
CB288050	Tristetraproline		
Processos Celulares			
	Divisão celular e divisão cromossomal	0.001	0.81
CB286453	Transmembrana 4 superfamília		31175659,00
	Biogênese celular	0.011	5.457.779
CB285754	Fosfolipase A2	1,41E+03	66.833.844
S/GB	Lisozima	9,23E+00	5.657.114
CB286816	Lisozima	7,04E+02	
CB288210	Precursos de Lisozima C		11.631.967
	Motilidade celular	0.002	0.758
CB287824	Citoqueratina 20	3,29E+00	1.108.339
CB286906	Citoqueratina 20	0.007	
CB287477	Miosina MRCL2		0.644
	Mecanismos de transdução de sinais	5,33E+02	28.715.765
		0.003	
CB285835	Anti proteinase citoplasmática		0.47
CB287183	CIDE-B ativador de apoptose		0.641
Metabolismo			
	Produção e conversão de energia	3,40E+02	21.321.461
		0.005	
CB285469	Malato desidrogenase	1,05E+04	
CB285272	ADP,ATP translocase 2		0.641
CB286703	Aldolase B	0.005	
	Transporte e metabolismo de carboidratos		19.689.115
CB285652	Sódio/Glicose cotransporte 1	0.028	
	Transporte e metabolismo de aminoácidos		0.772
CB286836	Sucrasede-isomaltase	1,95E+02	
	Transporte e metabolismo de nucleotídeos		4.111.835
CB287529	Transporte de ácidos nucleicos	0.002	0.685
	Metabolismo de lipídios	0.022	
CB286447	Proteína ligante a ácidos graxos		0.514
CB288165	Proteína ligante a ácidos graxos	0.006	16400766,00
Funções imunológicas			
CB285340	Cadeia J de imunoglobulina	0.012	10.411.985
CB285813	Precursor proteínas proteoglicanas	4,82E-01	12.731.892
CB286882	Expresso em linhagens hematopoiéticas	5,03E+02	3.253.304
CB287491	Precursor de Complemento 3	2,45E+03	62.336.106
CB287526	Precursor de proteína 1- pancreatite	5,38E+03	
CB287181	Precursor de proteína 1- pancreatite		

S/GB: Genes sem número no GenBank

Tabela 4 - Genes desconhecidos considerados mais expressos em PPj em relação aos MLNj e seus respectivos valores de p e do nível de expressão relativa.

PorkChip ID	GenBank	Valor p	Nível de expressão relativa
			10703421,00
			14923129,00
PPSL_03E12	CB285683	1,27E+01	0.509
PPSL_04B10	CB285751	0.001	0.536
PPSL_11D09	CB286518	4,55E+03	15.576.209
PPSL_11E04	CB286526	0.002	12.843.271
PPSL_21B09	CB287528	0.004	
PPSL_22E01	CB287707	0.003	

Genes mais expressos em linfonodos mesentéricos jejunais em relação às placas de Peyer

Dos 2.644 genes presentes no chip de microarray, 10 foram mais expressos em MLNj em relação às PPj. Todos os 10 genes (tabela 5) foram considerados estatisticamente significantes ($p < 0,05$), entre estes, 7 são genes desconhecidos e 2 foram confirmados pela PCR em tempo real.

Tabela 5 - Genes considerados mais expressos em MLNj em relação às PPj e seus respectivos valores de p e do nível de expressão relativa.

GenBank	Descrição	Valor p	Nível de expressão relativa
			-0.824
		0.001	-0.484
		9,39E+00	
CB285268	Precursor de citokina A19 (CCL19)		-0.564
CB286856	Precursor cadeia DR - HLA MHC classe II	2,80E+02	
CB287458	Precursor cadeia DQ - HLA MHC classe II	0.001	-0.674
		6,74E+00	-0.97
CB285710	Desconhecido	0.039	-0.593
CB287260	Desconhecido	0.001	-0.814
CB287422	Desconhecido	0.001	-0.937
CB288227	Desconhecido	7,70E+03	-0.554
AW231943	Desconhecido	1,44E+01	-0.795
AW231946	Desconhecido	5,00E-04	
AW231947	Desconhecido		

A figura 11 mostra a clusterização dos 33 genes super expressos pelas PPj e dos 10 genes super expressos pelo MLNj para cada animal. É possível observar a intensidade de expressão dos genes e a variabilidade da expressão existente entre os animais; entre os animais 1 e 3 pode ser observado uma

similaridade de expressão, entre os animais 2 e 6 também; já o animal 4 teve uma expressão diferenciada dos outros animais.

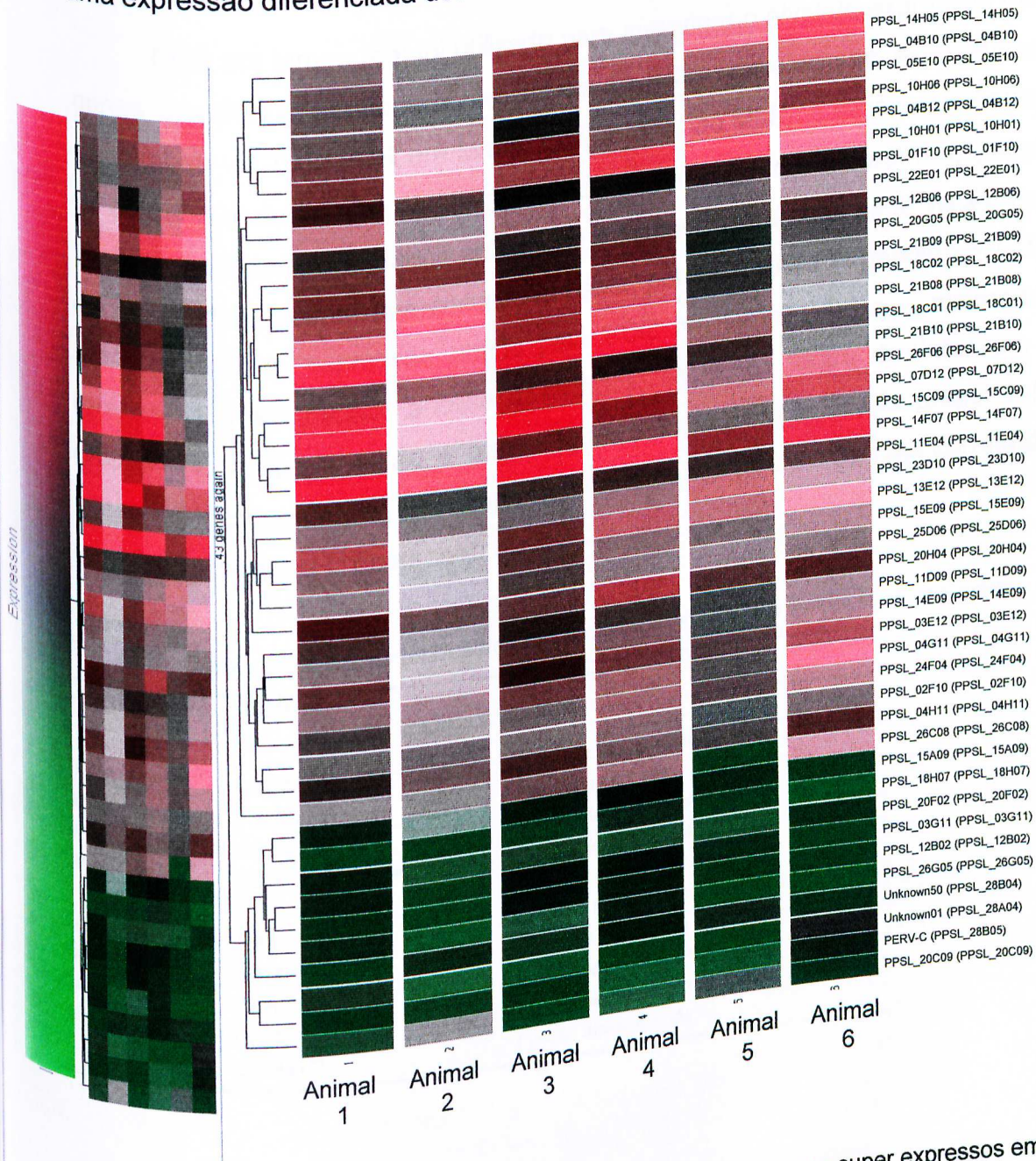


Figura 11 – Cluster dos 33 genes super expressos em PPj e dos 10 genes super expressos em MLNj. Os genes estão clusterizados de acordo com a similaridade da expressão para cada animal.

PCR em tempo real confirmando os dados do microarray

PCR em tempo real foi utilizado para investigar o nível de expressão de 9 genes escolhidos aleatoriamente (tabela 6). Para correlacionar estes dados, calculou-se $-\Delta Ct$, da PCR em tempo real, relativo ao MLNj; e para o microarray, foi utilizada a razão (PPj/MLNj) normalizadas por logaritmo natural (Ln) (tabela 7). Foram utilizados os dados obtidos de 4 leitões para ambas as técnicas. Dos dados obtidos, existiu uma correlação baixa, porém positiva (r pearson = 0,27) entre o nível de expressão obtido pela PCR em tempo real e o microarray (gráfico 1). Para melhor análise dos dados, os genes foram divididos em 2 grupos. No grupo 1 estão 4 genes (gráfico 2), a correlação do grupo 1 foi positiva (r pearson=0,86). No grupo 2 estão 5 genes (gráfico 3), cuja correlação também foi positiva (r pearson=0,7).

Tabela 6 - Genes utilizados na técnica de PCR em tempo real, para a validação do microarray.

Porkchip ID	GenBank	Nome comum	Descrição
Grupo 1			
PPSL_02F10	CB285469	MDH1	Malato desidrogenase
PPSL_12A02	CB285254	PI3	Precursor de Elafin
PPSL_26G05	CB288227		Função desconhecida
PPSL_19H04	CB287372	NM_138774	Função desconhecida
Grupo 2			
PPSL_17F11	CB287121	NCK1	Proteína 1 receptor tirosina quinase
PPSL_21A07	CB287508	CLCA1	Precursor da proteína 1 dos canais de Cl ⁻
PPSL_15E07	CB286904	PGK1	Fosfoglicerato quinase 1
PPSL_18H07	CB287260		Função desconhecida
PPSL_11A12	CB286471		Função desconhecida

Tabela 7 - Nível de expressão dos genes utilizados na PCR em tempo real. O nível de expressão do microarray foi calculado pela razão (PPj/ MLNj) normalizadas por log natural da razão e o da PCR em tempo real foi calculado pelo - Delta Ct (-ΔCt) relativo ao MLNj.

Porkchip ID	-ΔCt (PCR em tempo real)	Ln da Razão (PPj/ MLNj) (Microarray)
Grupo 1		2.0
PPSL_02F10	1.47	1.0
PPSL_12A02	0.63	0.75
PPSL_26G05	0.44	1.0
PPSL_19H04	-0.006	
Grupo 2		1.0
PPSL_17F11	-4.5	1.1
PPSL_21A07	-2.0	1.1
PPSL_15E07	-3.0	1.1
PPSL_18H07	-6.5	1.4
PPSL_11A12	-0.3	

Correlação do nível de expressão entre microarray e PCR em tempo real

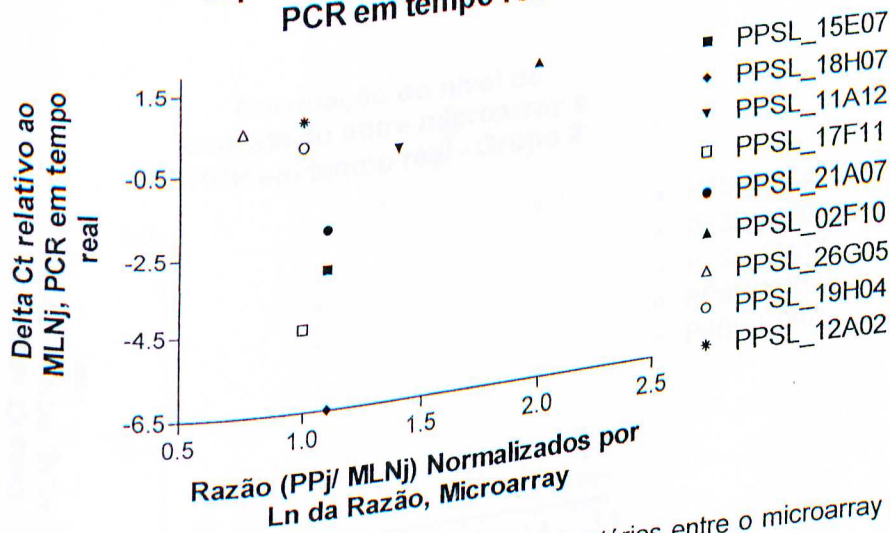


Gráfico 1 - Correlação da expressão de genes aleatórios entre o microarray e PCR em tempo real. O nível de expressão do microarray foi calculado pela razão (PPj/ MLNj) normalizadas por log natural da razão e o da PCR em tempo real foi calculado pelo - Delta Ct (-ΔCt) relativo ao MLNj.

084
AS
064

Correlação do nível de expressão entre microarray e PCR em tempo real - Grupo 1

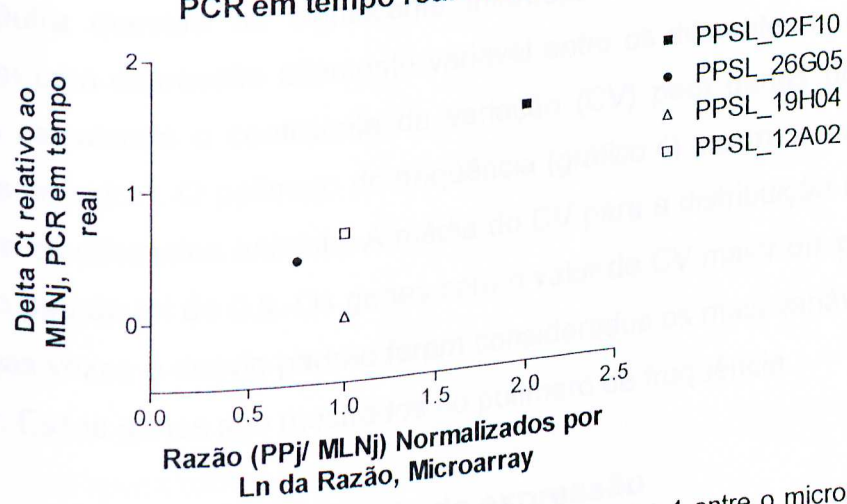


Gráfico 2 - Correlação da expressão de genes do grupo 1 entre o microarray e a PCR em tempo real. O nível de expressão do microarray foi calculado pela razão (PPj/ MLNj) normalizadas por log natural da razão e o da PCR em tempo real foi calculado pelo - Delta Ct (- Δ Ct) relativo ao MLNj.

Correlação do nível de expressão entre microarray e PCR em tempo real - Grupo 2

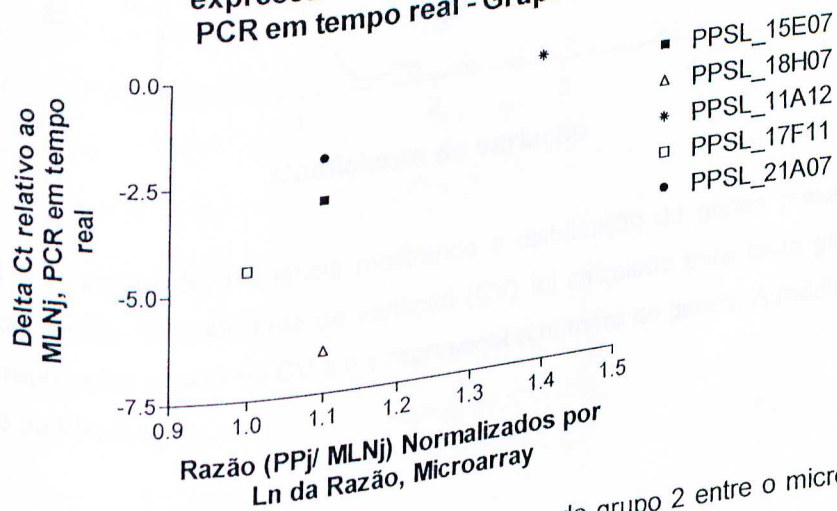


Gráfico 3 - Correlação da expressão de genes do grupo 2 entre o microarray e a PCR em tempo real. O nível de expressão do microarray foi calculado pela razão (PPj/ MLNj) normalizadas por log natural da razão e o da PCR em tempo real foi calculado pelo - Delta Ct (- Δ Ct) relativo ao MLNj.

Identificação da variabilidade de expressão gênica

Outra questão de significativo interesse diz respeito aos genes que possuem uma expressão altamente variável entre os diferentes animais, o que foi feito calculando o coeficiente de variação (CV) para genes presentes em todas as amostras. O polímero de frequência (gráfico 4) mostra a distribuição do CV entre os diferentes animais. A média do CV para a distribuição foi de 0,46 e o desvio padrão foi de 0,5. Os genes com o valor de CV maior ou igual a média mais duas vezes o desvio padrão foram considerados os mais variáveis entre os animais. Esses genes são mostrados no polímero de frequência.

Variabilidade de expressão gênica

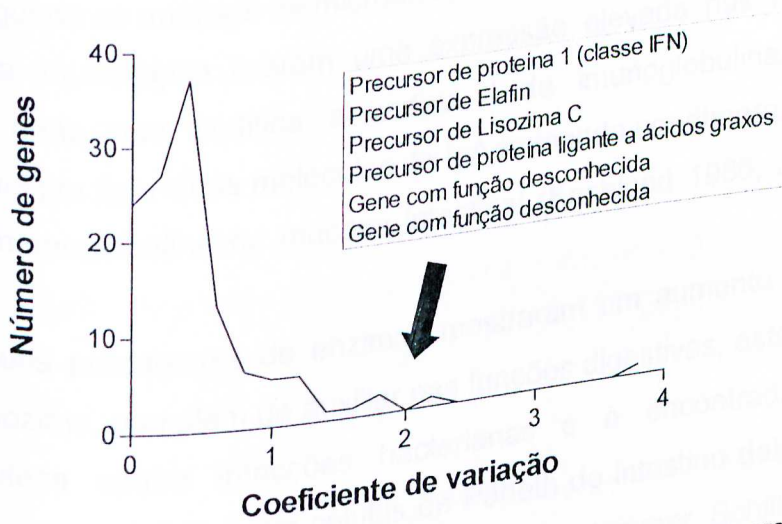


Gráfico 4 – Polímero de frequência mostrando a distribuição de genes presentes em 6 PPj normais de leitões. O coeficiente de variação (CV) foi calculado para cada gene presente. O eixo x representa o valor do CV e o y representa o número de genes. A média do CV foi 0,46 e o desvio padrão 0,5.

DISCUSSÃO

O uso de cDNA microarray para análises de expressão em grande escala tem comprovado ser útil gerando informações sobre funções celulares e teciduais (Perou, Jeffrey et al. 1999; Kelly and Rizzino 2000). No presente estudo, microarray foi utilizado para examinar a expressão de genes das PPj em relação aos MLNj em leitões. Segmentos intestinais de leitões contendo PPj foram usados como modelo de sistema imunológico competente e naïve.

Genes com expressão aumentada em placas de Peyer

Segundo as análises de microarray realizadas, alguns genes relacionados à resposta imunológica tiveram uma expressão elevada nas PPj. Como por exemplo, gene que codifica a cadeia J de imunoglobulina, esta que é responsável por ligar duas moléculas de IgA formando um dímero, que é a forma ativa da imunoglobulina na mucosa intestinal (Koshland 1985; Janeway C. A. 2001).

Alguns precursores de enzimas mostraram um aumento na expressão, como a lisozima, que além de auxiliar nas funções digestivas, está relacionada à imuno defesa contra infecções bacterianas e é encontrada em células fagocíticas, granulócitos e em células de Paneth do intestino delgado (Klockars and Osserman 1974; Klockars and Reitamo 1975; Hammer, Schilling et al. 1987; Hammer and Wilson 1987; Cross, Mangelsdorf et al. 1988; Cross and Renkawitz 1990; Steinhoff, Senft et al. 1994). A sucrase-isomaltase, responsável pela quebra de dissacarídeos e oligossacarídeos dos alimentos e ocorre especificamente no ápice de enterócitos jejunais (Green, Edwards et al. 1987) também teve uma expressão aumentada.

Outros genes que representam funções intestinais vitais mostraram uma expressão elevada. Entre eles podemos citar, primeiramente, o gene SGLT1 (Na^+ /glucose cotransporter) responsável pela absorção de glicose e galactose

dos alimentos no lúmen intestinal e está presente nos microvilos dos enterócitos (Turk, Klisak et al. 1993; Lee, Kanai et al. 1994; Turk, Martin et al. 1994). Além de outros, temos também o gene que codifica proteínas ligante de ácidos graxos, proteínas não enzimáticas envolvidas nas vias metabólicas e transporte de lipídios (Kaikaus, Bass et al. 1990), regulação e metabolismo de proteínas (Warnock, Campbell et al. 2000), crescimento e diferenciação celular (Yang, Spitzer et al. 1994; Delva, Bastie et al. 1999) e sinalização do metabolismo e síntese de ácidos graxos (Helledie, Antonius et al. 2000; Wolfrum and Spener 2000; Wolfrum, Borrmann et al. 2001) e são tecido-específicas presente no intestino (Lucke, Huang et al. 2002).

Podemos citar também os genes envolvidos na motilidade celular, como o gene que sintetiza a citoqueratina 20, que compõe o citoesqueleto de células e é expresso preferencialmente em enterócitos (Franke, Schmid et al. 1978; Franke, Weber et al. 1978; Sun and Green 1978; Fuchs and Green 1980; Franke, Schiller et al. 1981; Fuchs, Coppock et al. 1981; Franke, Schmid et al. 1982; Moll, Franke et al. 1982; Tseng, Jarvinen et al. 1982; Fuchs and Marchuk 1983; Fuchs, Tyner et al. 1987; Steinert and Roop 1988). Além desses, o gene que codifica a cadeia leve regulatória de miosina que é uma enzima importante para a contração muscular (Sellers, Adelstein et al. 1987; Lehninger, Nelson et al. 1995).

Genes com expressão aumentada em linfonodos mesentéricos jejunais.

As análises de microarray mostraram que 10 genes das PPj tiveram uma expressão aumentada em MLNj. A função de somente 3 destes genes é conhecida: o gene que codifica a citocina A19 (CCL19) e 2 genes que codificam complexo de histocompatibilidade classe II (MHC classe II).

Durante o processo de maturação, as células dendríticas mudam os receptores de citocinas para migrar dos tecidos periféricos, como das PPs aos LNs (Yanagawa and Onoe' 2002). Estas, quando maduras, expressam receptores CCR7 que são receptores de quimiocinas CCL19 e CCL21 (Dieu,

Vanbervliet et al. 1998; Dieu-Nosjean, Vicari et al. 1999; Sato, Kawasaki et al. 2001; Okada, Ngo et al. 2002). Ambas são pequenas proteínas constitutivas e altamente expressas em LNs e baço (Cyster 1999; Sallusto, Mackay et al. 2000). A interação do receptor CCR7 com as quimiocinas é essencial para o processo de migração de CDs para os LNs regionais. As CDs maduras expressam MHC classe II juntamente com outras moléculas coestimulatórias, que estão associadas com a potente capacidade de apresentação de antígenos (Yanagawa and Onoe' 2002). Segundo Okada et al e Warnock et al (Warnock, Campbell et al. 2000; Okada, Ngo et al. 2002) a quimiocina CCL19 também tem sido observada em VEAs de LNs e PPs, onde promove adesão a linfócitos .

Identificação da variabilidade de expressão gênica

O cálculo do coeficiente de variação (CV) para genes presentes em todas as amostras foi feito com o objetivo de mostrar genes que possuem uma expressão altamente variável entre os diferentes animais. Neste estudo, a média do CV foi de 46%, sendo que 6 genes apresentaram um CV acima de 150%. Diferentemente do estudo apresentado por Hsiao et al (Hsiao, Dangond et al. 2001) com a análise da expressão gênica de tecidos humanos normais, e que obtiveram um CV médio de 31% com 9 genes que tiveram um CV significativo acima de 80%.

Os genes encontrados com uma alta variabilidade estão associados com o sistema de defesa do intestino, como o precursor de lisozima, o precursor da proteína 1 da família dos IFNs e o precursor de elafin e também o gene que codifica a proteína ligante de ácidos graxos. Além de 2 genes com funções ainda desconhecidas. Estes resultados são devido a variabilidade gênica existente entre os animais e provavelmente, ao pequeno número de amostra.

PCR em tempo real confirmando os dados do microarray

A análise dos dados de 9 genes foi feita dividindo os genes em 2 grupos. Esta análise foi realizada por grupos pois as técnicas apresentam sensibilidade diferenciadas quanto a concentração do cDNA molde. O grupo 1 mostrou uma correlação positiva e significativa entre a técnica de PCR em tempo real e a tecnologia do microarray para a expressão gênica, enquanto que no grupo 2 a correlação foi positiva, mas a expressão foi negativa para a PCR em tempo real. Este fato pode ocorrer provavelmente devido ao excesso de cDNA na amostra, que inibe a detecção por PCR em tempo real. Enquanto a PCR é altamente influenciada pela concentração da amostra, que pode variar em até 500 ng de molde, a detecção de fluorescência pela tecnologia de microarray pode detectar um sinal linear por incorporação direta da sonda na hibridação que varia até 10 mg de RNA total (Duggan 1999). Os 9 genes analisados apresentaram, no microarray, uma proporção de expressão próxima ou maior do que 1, sendo que a escolha destes genes foi aleatória. A alta variabilidade existente entre os animais em conjunto com a sensibilidade das técnicas contribuíram para estes resultados.

Dos 4 genes do grupo 1, estão incluídos 2 genes cujas funções ainda são desconhecidas e 1 deles com uma alta expressão em MLNj em relação às PPj. Os outros 2 genes foram mais expressos em PPj em relação aos MLNj são eles: o gene que codifica a enzima malato desidrogenase, fundamental à interconversão de malato a oxaloacetato no ciclo do ácido cítrico, está presente na matriz mitocondrial e no citoplasma de células eucarióticas (Tanaka, Inazawa et al. 1996; Marzzoco and Torres 1999); e o precursor de elafin, que é uma enzima inibidora de elastase, é sintetizada e secretada no local em que há injúria sendo produzida em resposta a citocinas como IL-1 e TNF (Sallenave, J et al. 1994) e foi isolada no intestino delgado de suínos (Suzuki, Furukawa et al. 2000).

No grupo 2, estão 2 genes, cujas funções são desconhecidas. Entre os outros 3 genes estão, o gene que codifica a enzima fosfoglicerinato quinase que

atua nos ciclos de glicogênese (Lehninger, Nelson et al. 1995; Marzzoco and Torres 1999), o gene que codifica a proteína 1 dos canais de Cl^- que estão presentes em todas as células e são responsáveis pelo transporte transepitelial e também atuam na regulação de volume e de pH das organelas e controle da atividade sináptica (Nilius and Droogmans 2003) e o gene NCK1 que codifica a proteína 1 da região catalítica do receptor da enzima tirosina quinase (Lehninger, Nelson et al. 1995).

Conclusão

O principal objetivo deste trabalho foi analisar genes que têm maior expressão em PPj e em MLNj. As PPj e os MLNj, considerados órgãos linfóides secundários e intimamente relacionados a resposta imunológica intestinal. Utilizando MLNj como referência no microarray, para analisar o perfil da expressão gênica de PPj encontrou-se uma expressão aumentada de 92 genes, estes com funções relacionadas ao mecanismo de defesa do intestino, ao metabolismo celular entre outras. Vinte e três genes com funções desconhecidas foram encontrados como tendo uma alta expressão em PPj em relação aos MLNj e em MLNj em relação à PPj, 7 genes ainda não possuem as funções conhecidas. Dos genes das PPj, somente genes relacionados ao processamento de antígenos (3 genes) foram encontrados na amostra referência (MLNj) com uma expressão aumentada, em relação às PPj.

A tecnologia de microarray, que vem sendo utilizada para a análise gênica em grande escala, mostrou-se precisa para a análise de expressões gênicas, porém, quando utilizamos a técnica de PCR em tempo real para a confirmação da expressão, houve uma discrepância quanto a expressão detectada pelo microarray. A expressão do microarray teve uma correlação positiva com a PCR em tempo real para os genes do grupo 1, porém nos genes do grupo 2, a expressão na PCR em tempo real foi negativa, possivelmente devido ao excesso de cDNA molde na amostra.

A correlação entre os resultados de expressão gênica entre o microarray e a PCR em tempo real faz do microarray uma tecnologia de escolha para a análise de expressão gênica em grande escala, permitindo que a correlação entre os processos biológicos e os genes diferencialmente expressos seja estabelecida, determinando em um futuro próximo padrões gênicos comportamentais tecido-específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agerberth, B., H. Gunne, et al. (1996). "PR-39, a proline-rich peptide antibiotic from pig, and FALL-39, a tentative human counterpart." Vet Immunol Immunopathol **54**(1-4): 127-31.
- Battaglia, C., G. Salani, et al. (2000). "Analysis of DNA microarrays by non-destructive fluorescent staining using SYBR green II." Biotechniques **29**(1): 78-81.
- Benes, V. and M. Muckenthaler (2003). "Standardization of protocols in cDNA microarray analysis." Trends Biochem Sci **28**(5): 244-9.
- Cleveland, W. S., S. J. Devlin (1988). "Locally-Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting." J.A.S.A. **83**: 596-610.
- Cross, M., I. Mangelsdorf, et al. (1988). "Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6232-6.
- Cross, M. and R. Renkawitz (1990). "Repetitive sequence involvement in the duplication and divergence of mouse lysozyme genes." Embo J **9**(4): 1283-8.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." Science **286**(5447): 2098-102.
- Delva, L., J. N. Bastie, et al. (1999). "Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex." Mol Cell Biol **19**(10): 7158-67.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, et al. (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." J Exp Med **188**(2): 373-86.
- Dieu-Nosjean, M. C., A. Vicari, et al. (1999). "Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines." J Leukoc Biol **66**(2): 252-62.
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, J.M. (1999). "Expression profile using cDNA microarrays." Nat. Genet. **21**: 10-14.
- Eisen, M. B. and O. Brown (1999). "DNA arrays for analysis of gene expression." Methods Enzymol. **303**: 179-205.
- Franke, W. W., D. L. Schiller, et al. (1981). "Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues." J Mol Biol **153**(4): 933-59.
- Franke, W. W., E. Schmid, et al. (1978). "Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 5034-8.
- Franke, W. W., E. Schmid, et al. (1982). "Differentiation-related patterns of expression of proteins of intermediate-size filaments in tissues and cultured cells." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **46 Pt 1**: 431-53.
- Franke, W. W., K. Weber, et al. (1978). "Antibody to prekeratin. Decoration of tonofilament like arrays in various cells of epithelial character." Exp Cell Res **116**(2): 429-45.

- Fuchs, E. and H. Green (1980). "Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte." Cell **19**(4): 1033-42.
- Fuchs, E. and D. Marchuk (1983). "Type I and type II keratins have evolved from lower eukaryotes to form the epidermal intermediate filaments in mammalian skin." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(19): 5857-61.
- Fuchs, E., A. L. Tyner, et al. (1987). "The human keratin genes and their differential expression." Curr Top Dev Biol **22**: 5-34.
- Fuchs, E. V., S. M. Coppock, et al. (1981). "Two distinct classes of keratin genes and their evolutionary significance." Cell **27**(1 Pt 2): 75-84.
- Green, F., Y. Edwards, et al. (1987). "Isolation of a cDNA probe for a human jejunal brush-border hydrolase, sucrase-isomaltase, and assignment of the gene locus to chromosome 3." Gene **57**(1): 101-10.
- Hammer, M. F., J. W. Schilling, et al. (1987). "Recruitment of lysozyme as a major enzyme in the mouse gut: duplication, divergence, and regulatory evolution." J Mol Evol **24**(3): 272-9.
- Hammer, M. F. and A. C. Wilson (1987). "Regulatory and structural genes for lysozymes of mice." Genetics **115**(3): 521-33.
- Hecht, G. (1999). "Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine." Am J Physiol **277**(3 Pt 1): C351-8.
- Helledie, T., M. Antonius, et al. (2000). "Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm." J Lipid Res **41**(11): 1740-51.
- Hsiao, L. L., F. Dangond, et al. (2001). "A compendium of gene expression in normal human tissues." Physiol. Genomics **7**(2): 97-104.
- Janeway C. A., T. P., Walport M., Shlomchik M. J. (2001). Immunobiology. New York, Garland.
- Junqueira L. C., C. J., Kelly R. O. (1995). Histologia Básica. Norwalk, CT, Appleton and Lange.
- Kaikaus, R. M., N. M. Bass, et al. (1990). "Functions of fatty acid binding proteins." Experientia **46**(6): 617-30.
- Kelly, D. L. and A. Rizzino (2000). "DNA microarray analyses of genes regulated during the differentiation of embryonic stem cells." Mol Reprod Dev **56**(2): 113-23.
- Klockars, M. and E. F. Osserman (1974). "Localization of lysozyme in normal rat tissues by an immunoperoxidase method." J Histochem Cytochem **22**(3): 139-46.
- Klockars, M. and S. Reitamo (1975). "Tissue distribution of lysozyme in man." J Histochem Cytochem **23**(12): 932-40.
- Korthuis, R. J., D. C. Gute, et al. (1999). "PR-39, a proline/arginine-rich antimicrobial peptide, prevents postischemic microvascular dysfunction." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): H1007-13.
- Koshland, M. E. (1985). "The coming of age of the immunoglobulin J chain." Annu Rev Immunol **3**: 425-53.
- Lee, W. S., Y. Kanai, et al. (1994). "The high affinity Na⁺/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression." J Biol Chem **269**(16): 12032-9.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, et al. (1995). Principios de Bioquímica. São Paulo.

- Lucke, C., S. Huang, et al. (2002). "New insights into intracellular lipid binding proteins: The role of buried water." Protein Sci **11**(10): 2382-92.
- Marzzoco, A. and B. B. Torres (1999). Bioquimica Basica.
- Moll, R., W. W. Franke, et al. (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." Cell **31**(1): 11-24.
- Mowat, A. M. and J. L. Viney (1997). "The anatomical basis of intestinal immunity." Immunol. Rev. **156**: 145-66.
- Nadon, R. and J. Shoemaker (2002). "Statistical issues with microarrays: processing and analysis." Trends Genet **18**(5): 265-71.
- Neutra, M. R. (1998). "Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system." Am J Physiol **274**(5 Pt 1): G785-91.
- Nilius, B. and G. Droogmans (2003). "Amazing chloride channels: an overview." Acta Physiol Scand **177**: 119-147.
- Okada, T., V. N. Ngo, et al. (2002). "Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches." J Exp Med **196**(1): 65-75.
- Perou, C. M., S. S. Jeffrey, et al. (1999). "Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9212-7.
- Sallenave, J. M., S. J, et al. (1994). "Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes." Am J Respir Cell Mol Biol **11**: 733-741.
- Sallusto, F., C. R. Mackay, et al. (2000). "The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses." Annu Rev Immunol **18**: 593-620.
- Sanderson, I. R. and W. A. Walker (1994). Mucosal barrier. In: Handbook of mucosal immunology. Ogra, P.A., Strober, W., Mestecky, J., Lamm, M.E., McGhee, J.R., Bienenstock, J. San Diego, CA, Academic Press.
- Sato, K., H. Kawasaki, et al. (2001). "Signaling events following chemokine receptor ligation in human dendritic cells at different developmental stages." Int Immunol **13**(2): 167-79.
- Savage, D. C. (1977). "Microbial ecology of the gastrointestinal tract." Annu Rev Microbiol **31**: 107-33.
- Schena, M., D. Shalon, et al. (1996). "Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**(20): 10614-9.
- Steinert, P. M. and D. R. Roop (1988). "Molecular and cellular biology of intermediate filaments." Annu Rev Biochem **57**: 593-625.
- Steinhoff, U. M., B. Senft, et al. (1994). "Lysozyme-encoding bovine cDNAs from neutrophilic granulocytes and mammary gland are derived from a different gene than stomach lysozymes." Gene **143**(2): 271-6.
- Sun, T. T. and H. Green (1978). "Immunofluorescent staining of keratin fibers in cultured cells." Cell **14**(3): 469-76.
- Suzuki, Y., M. Furukawa, et al. (2000). "Localization of porcine trappin-2 (SKALP/elafin) in trachea and large intestine by in situ hybridization and immunohistochemistry." Histochem Cell Biol **114**(1): 15-20.

- Tanaka, T., J. Inazawa, et al. (1996). "Molecular cloning and mapping of a human cDNA for cytosolic malate dehydrogenase (MDH1)." Genomics **32**: 128-130.
- Tseng, S. C., M. J. Jarvinen, et al. (1982). "Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies." Cell **30**(2): 361-72.
- Turk, E., I. Klisak, et al. (1993). "Assignment of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1 to chromosome 22q13.1." Genomics **17**(3): 752-4.
- Turk, E., M. G. Martin, et al. (1994). "Structure of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1." J Biol Chem **269**(21): 15204-9.
- van der Waaij, D. (1989). "The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*." Annu Rev Microbiol **43**: 69-87.
- Warnock, R. A., J. J. Campbell, et al. (2000). "The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules." J Exp Med **191**(1): 77-88.
- Wolfrum, C., C. M. Borrmann, et al. (2001). "Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2323-8.
- Wolfrum, C. and F. Spener (2000). "Fatty acids as regulators of lipid metabolism." Eur. J. Lipid Sci. Technol. **102**: 746±762.
- Yanagawa, Y. and K. Onoe' (2002). "CCL19 Controls dendritic cell morphology." Blood **100**(6): 1948-1956.
- Yang, I. V., E. Chen, et al. (2002). "Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays." Genome Biol **3**(11): research0062.
- Yang, Y., E. Spitzer, et al. (1994). "Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland." J Cell Biol **127**(4): 1097-109.
- Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, , T. Speed (2001). Normalization for cDNA Microarray Data. San Hose, CA.
- Zhang, G., C. R. Ross, et al. (2000). "Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense." Vet Res **31**(3): 277-96.