

## XII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Ribeirão Preto, SP – 12 e 13 de junho de 2017

### Identificação de mecanismos genéticos envolvidos na osteocondrose *latens* em suínos

Gabrieli de Souza Romano<sup>1</sup>, Adriana Mércia Guaratini Ibelli<sup>2</sup>, Jane de Oliveira Peixoto<sup>2</sup>, Nelson Morés<sup>2</sup>, Marcos Antonio Zanella Morés<sup>2</sup>, Maurício Egídio Cantão<sup>2</sup>, Raquel Rubia Rech<sup>3</sup>, Igor Ricardo Savoldi<sup>4</sup>, Kamilla Bleil do Carmo<sup>4</sup>, Elsie Antonio Pereira de Figueiredo<sup>2</sup>, Luiz Lehman Coutinho<sup>5</sup>, Mônica Corrêa Ledur<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

<sup>3</sup>Texas A&M University, College Station, Texas, USA

<sup>4</sup>Universidade do Contestado, Concórdia, SC, Brasil

<sup>5</sup>Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil

\*Autor correspondente: monica.ledur@embrapa.br

**Resumo:** A osteocondrose (OC) é uma das principais causas de claudicação em suínos, afetando até 80% dos animais reprodutores e de produção, levando a perdas econômicas e reduzindo o bem estar. Com o objetivo de identificar genes e mecanismos genéticos envolvidos em estágios iniciais de OC em suínos, amostras da cartilagem articular distal do fêmur de 3 marrãs normais (controle) e 3 afetadas com OC *latens* foram coletadas, submetidas a análise histológica e extração total do RNA. As bibliotecas de RNA foram preparadas e sequenciadas em equipamento HiSeq 2500 (2x100pb). As sequências foram submetidas ao controle de qualidade e 98% delas foram mapeadas no genoma do suíno (Ensembl 84). A expressão diferencial foi obtida utilizando-se o EdgeR e a anotação funcional foi realizada com a ferramenta DAVID. Um total de 11.231 genes foi expresso na cartilagem do fêmur e 2.019 genes foram diferencialmente expressos, sendo 1.040 mais expressos e 979 menos expressos no grupo afetado com OC, incluindo genes codificantes, lincRNA e miRNAs. Considerando a análise funcional, diversos processos biológicos foram encontrados, tais como regulação da matriz extracelular, ossificação, ativação endotelial e estresse oxidativo. Novos mecanismos envolvidos na manifestação da OC *latens* foram evidenciados, contribuindo para o melhor entendimento desta condição em suínos e outras espécies de mamíferos que apresentam problemas locomotores como similares a osteocondrose.

**Palavras-chave:** claudicação, RNA-Seq, transcriptoma.

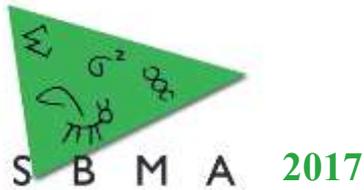
### Identification of genetic pathways involved with osteochondrosis *latens* in pigs

**Abstract:** Osteochondrosis (OC) is a major cause of lameness in sows and finisher pigs, affecting up to 80% of the animals, leading to economic losses and reducing the animal welfare. Aiming to identify genes and genetic mechanisms involved in the early stage of OC in pigs, samples of the distal femoral articular cartilage of 3 gilts (5 months of age) with OC *latens* and 3 normal gilts (control) were collected, submitted to histological analysis and total RNA extraction. RNA-Seq libraries were prepared and sequenced in HiSeq 2500 equipment (2x100pb). The reads were processed, cleaned and 98% were mapped to the pig genome (Ensembl 84). Differential expression (DE) was obtained using EdgeR and functional annotation was performed with the DAVID database. A total of 11.231 genes was expressed in femoral cartilage and 2.019 were DE, being 1.040 upregulated and 979 downregulated in the OC group, including coding genes, lincRNA and miRNAs. Considering the functional analysis, several biological processes were found, such as those related to regulation of extracellular matrix, ossification, endothelial activation and oxidative stress. We demonstrated novel pathways involved with OC *latens* contributing to the understanding of its pathophysiology in swine and other mammalian species.

**Keywords:** lameness, RNA-Seq, transcriptome.

### Introdução

A osteocondrose é uma desordem de crescimento ósseo que afeta a cartilagem e ocorre em diversas espécies de animais, incluindo suínos, sendo considerada uma das principais causas de *leg weakness* e claudicação (Nakano; Brennan; Aherne, 1987), sendo um dos principais problemas na



## XII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Ribeirão Preto, SP – 12 e 13 de junho de 2017

produção de suínos (Laenoi et al., 2010). Esta condição apresenta correlação negativa com características de desempenho como longevidade das reprodutoras, taxa de crescimento, conversão alimentar e rendimento de carcaça (Jorgensen;Nielsen, 2005). Devido à natureza e complexidade das lesões, a etiologia da osteocondrose é considerada de ordem multifatorial e não está totalmente estabelecida (Laenoi et al., 2010). Entretanto, diferenças encontradas na prevalência dessa condição entre diferentes raças e linhagens de suínos indicam fortemente que há um componente genético envolvido na ocorrência de osteocondrose (Etterlin et al., 2017). Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi identificar genes e mecanismos genéticos envolvidos na manifestação da osteocondrose *latens* em suínos por meio da análise de sequenciamento de RNA.

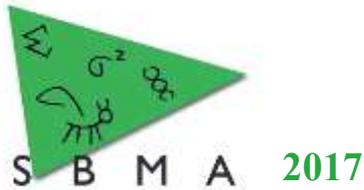
### Material e Métodos

Para este trabalho foram selecionadas 15 marrãs (5 meses de idade) com dificuldades de locomoção e 15 sem problemas aparentes de locomoção, provenientes da granja de suínos da Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia-SC, criadas em mesmas condições de manejo. Foi realizada a necropsia, os ossos do fêmur foram dissecados para análise macroscópica e microscópica da cartilagem articular para caracterização da osteocondrose e escolha dos animais dos grupos afetado e controle. Após as análises histológicas, 3 amostras normais e 3 amostras afetadas foram submetidas a extração de RNA utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, associada com purificação em coluna de sílica (Qiagen). A qualidade e quantidade do RNA total foram avaliadas em espectrofotômetro Biodrop e no Bioanalyzer Agilent 2100. As bibliotecas foram preparadas utilizando-se o kit *TruSeq Total Stranded Sample Preparation* (Illumina) e o sequenciamento *paired-end* (2x100 bp) foi realizado em equipamento HiSeq 2500 (Illumina) no Centro de Genômica Funcional da ESALQ-USP. As sequências foram submetidas ao controle de qualidade no software SeqyClean (<https://github.com/ibest/seqyclean>), mapeadas contra o genoma de referência do suíno (*Sus scrofa*, Ensembl 84) no software BWA-MEM (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) e contagem das *reads* no pacote HT-Seq ([www-huber.embl.de/HTSeq/](http://www-huber.embl.de/HTSeq/)). A análise de expressão gênica diferencial foi obtida utilizando-se o pacote EdgeR (<http://bioconductor.org/packages/edgeR/>) do Bioconductor no R. Uma vez obtidos os genes diferencialmente expressos (DE), a anotação funcional foi realizada utilizando-se a base de dados DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) e a ferramenta Revigo (<http://revigo.irb.hr/>) para a clusterização dos processos biológicos relacionados.

### Resultados e Discussão

As bibliotecas sequenciadas produziram em média 27 milhões de reads por amostra. O controle de qualidade removeu artefatos de PCR, sequências contaminantes (phiX), adaptadores de sequenciamento da Illumina, sequências poly A/T, bases em regiões de qualidade Phred < 24 e reads menores que 70 bases, totalizando a remoção de cerca de 4 milhões de *reads* por amostra. As sequências foram mapeadas em média em 98% do genoma suíno, sendo que destas, aproximadamente 55,6% estavam em regiões gênicas.

Um total de 11.231 genes foi expresso na cartilagem articular distal do fêmur de suínos, sendo que 2.019 foram DE (FDR<0.05), dos quais 1.040 foram mais expressos e 979 menos expressos no grupo afetado com OC. Entre estes, estão genes codificantes de proteínas, lincRNAs e miRNAs. Considerando a análise funcional, diversos processos biológicos (PB) relacionados à regulação da matriz extracelular, ossificação e ativação endotelial foram identificados, nos quais se destacam os genes *GPM6B*, *RASI*, *BMPRs*, *TGFBR1*, *TCF4*, já relatados na literatura como possíveis responsáveis pelo aparecimento de lesões osteocondríticas (Etterlin et al., 2017). Além disso, novos PB e genes como aqueles envolvidos com a biossíntese de macromoléculas (*RPLs*, *TRAP1*), adesão celular (*KDR*, *ROCK1*), estresse oxidativo (*SOD3*, *ROMO1*), sinalização TOR (*EIF4EBP2*, *RICTOR*) e processos de transporte de mitocôndria (*RHOT2*, *KIF1B*) também foram identificados como associados à manifestação de OC *latens* em suínos comerciais. Muitos destes genes DE contribuem para a manutenção da homeostasia do crescimento e desenvolvimento da cartilagem, atuando na tradução de proteínas, sinalização celular e catabolismo. A desregulação destes processos biológicos, que pode ser desencadeada pela resposta a diferentes estímulos endógenos ou externos, pode afetar a atividade dos condrocitos e a formação da cartilagem, por exemplo, reduzindo a angiogênese. Além disso, sabe-se que em resposta as situações adversas, há um aumento do



## XII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Ribeirão Preto, SP – 12 e 13 de junho de 2017

estresse oxidativo, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e conseqüentemente, dos processos inflamatórios nos animais. Em diversas espécies, o desbalanço em genes destas vias metabólicas já foi relacionado à diminuição da angiogênese, à formação de condrócitos e diferenciação de osteoblastos, podendo desencadear diversas doenças articulares e ósseas (Mody et al., 2001; Pellegrini et al., 2017). Desta maneira, é possível que o aumento das ROS e a menor expressão de genes com funções antioxidantes, assim como a variação na expressão dos genes envolvidos nas outras vias encontradas neste trabalho, estejam envolvidos na manifestação desta condição em suínos.

### Conclusão

Neste trabalho, o transcriptoma da cartilagem articular do fêmur de suínos normais e afetados com osteocondrose foi obtido. Além disso, foram identificados novos mecanismos e genes diferencialmente expressos envolvidos com a manifestação da osteocondrose em suínos, tais como os relacionados com estresse oxidativo e sinalização TOR, contribuindo para o melhor entendimento desta condição em suínos e outras espécies de mamíferos que também apresentam problemas locomotores similares a osteocondrose.

### Agradecimentos

Este projeto foi financiado pelo CNPq, processo número 480575-2013-4. Os autores agradecem Alexandre L. Tessmann pela assistência técnica e a concessão das bolsas de estudos de GSB pela Fapesb e de IRS e KBS pelo CNPq/Pibic-Embrapa.

### Literatura citada

- ETTERLIN, P.E.; EKMAN, S.; STRAND, R.; OLSTAD, K.; LEY, C.J. Osteochondrosis, Synovial Fossae, and Articular Indentations in the Talus and Distal Tibia of Growing Domestic Pigs and Wild Boars. **Veterinary Pathology**, 2017. doi: 10.1177/0300985816688743.
- JORGENSEN, B.; NIELSEN, B. Genetic parameters for osteochondrosis traits in elbow joints of crossbred pigs and relationships with production traits. **Animal Science**, v.81, p.319-324, 2005.
- LAENOI W, UDDIN MJ, CINAR MU, PHATSARA C, TEFAYE D, SCHOLZ AM, THOLEN E, LOOFT C, MIELENZ M, SAUERWEIN H, SCHELLANDER K. Molecular characterization and methylation study of matrix gla protein in articular cartilage from pig with osteochondrosis. **Gene**, v.459, p.24-31, 2010.
- MODY, N.; PARHAMI, F.; SARAFIAN, T.A.; DEMER, L.L. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p.509-519, 2001.
- NAKANO, T.; BRENNAN, J.J.; AHERNE, F.X. Leg weakness and osteochondrosis in swine: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, v.67, p.883 – 901, 1987.
- PELLEGRINI G.G.; CREGOR M.; MCANDREWS K.; MORALES C.C.; MCCABE L.D.; MCCABE G.P.; PEACOCK M.; BURR D.; WEAVER C.; BELLIDO T. Nrf2 regulates mass accrual and the antioxidant endogenous response in bone differently depending on the sex and age. **Plos One**, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0171161.