

Genes diferencialmente expressos no transcriptoma de suínos normais e afetados com hérnia escrotal

Gabrieli de Souza Romano^{1*}, Adriana Mércia Guaratini Ibelli², Jane de Oliveira Peixoto², Mauricio Egídio Cantão², Tomás Weber³, Marcos Antonio Zanella Morés², Nelson Morés², Victor Breno Pedrosa⁴, Luis Fernando Batista Pinto¹, Luiz Lehmann Coutinho⁵, Mônica Corrêa Ledur²

¹Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil.

³BRF S.A., Curitiba, PR, Brasil.

⁴Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brasil.

⁵Universidade de São Paulo/ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil.

*Autor correspondente: gabisouza_romano@yahoo.com.br

Resumo: A incidência de hérnias escrotais em suínos é preocupante para a indústria suinícola devido a perdas econômicas significativas e ao impacto negativo no bem-estar animal. As vias metabólicas e os genes envolvidos nessa patologia permanecem pouco conhecidos. Na tentativa de esclarecer os mecanismos genéticos envolvidos na ocorrência da hérnia escrotal em suínos, objetivou-se identificar os genes diferencialmente expressos entre suínos normais e afetados por essa anomalia, por meio da tecnologia de RNA-Seq. Foram utilizados 8 suínos da raça Landrace (4 normais e 4 com hérnia escrotal). O sequenciamento do mRNA foi realizado em equipamento HiSeq 2500 da Illumina. Os genes diferencialmente expressos foram obtidos utilizando-se o pacote EdgeR, com base no *False Discovery Rate* ($FDR \leq 0,05$). Um total de 13.035 genes foi expresso no tecido herniário e não herniário dos suínos, dos quais 644 foram diferencialmente expressos entre os suínos normais e afetados. Após a análise de ontologia gênica (GO), alguns genes candidatos foram prospectados. O conhecimento dos genes que controlam esse distúrbio pode apoiar estratégias de melhoramento para a redução dessa anomalia na produção de suínos.

Palavras-chave: doença congênita, genes diferencialmente expressos, RNA-Seq, transcriptoma

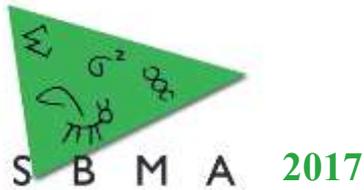
Differentially expressed genes in the transcriptome of normal and affected pigs with scrotal hernia

Abstract: The incidence of scrotal hernias in pigs is a concern to the pig industry due to the significant economic losses and the negative impact on welfare. The genetic pathways and genes involved in this pathology remain unknown. To better understand the genetic mechanisms involved in the occurrence of scrotal hernia in pigs, the aim of this study was to identify differentially expressed genes between normal and affected pigs with this anomaly, using RNA-Seq technology. In this study, Landrace pigs were used (4 normal and 4 with scrotal hernia). Sequencing of mRNA was performed in the Illumina HiSeq 2500 equipment. Differentially expressed genes were obtained using the EdgeR package, based on the False Discovery Rate ($FDR \leq 0.05$). A total of 13,035 genes were found to be expressed in the hernial and non-hernial tissue. From those, 644 differentially expressed genes were identified between normal and affected pigs. After gene ontology analyses, some candidate genes were prospected. The knowledge of the genes that control this disorder could support breeding strategies for reducing this anomaly in the pig production.

Keywords: congenital disease, differentially expressed genes, RNA-Seq, transcriptome

Introdução

O sistema de produção de suínos utiliza-se de animais intensamente selecionados para características produtivas e reprodutivas. Por outro lado, características relacionadas à saúde animal não são selecionadas com tanto rigor. Dessa forma, a incidência de algumas doenças congênitas, como as hérnias, ainda tem ocasionado significativas perdas econômicas e impacto negativo sobre o bem-estar animal (Grindflek et al., 2006). Mesmo que alguns esforços tenham sido feitos para selecionar animais contra essas anormalidades, os ganhos genéticos obtidos são ainda insatisfatórios. A hérnia escrotal é uma



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

das doenças congênitas importantes que acometem suínos comerciais. No Brasil, estima-se que 544 mil animais são comercializados com hérnias por ano, os quais apresentam menor valor de mercado que animais normais. Além disso, os índices zootécnicos dos animais afetados são reduzidos, podendo ocorrer óbitos de aproximadamente 50%, como consequência da anomalia, causando impacto significativo para o setor suinícola (Cutler et al., 2006; IBGE, 2015). As vias metabólicas e os genes envolvidos nessa patologia ainda não foram completamente compreendidos. O esclarecimento dos mecanismos genéticos envolvidos na manifestação da hérnia escrotal poderá trazer benefícios econômicos importantes para o setor suinícola. Desta maneira, o objetivo deste estudo foi identificar genes diferencialmente expressos (DE) no transcriptoma de suínos normais e acometidos com essa anomalia.

Material e Métodos

Foram utilizados oito suínos machos de uma linhagem da raça Landrace, com aproximadamente 30 dias de idade, provenientes da mesma granja núcleo. Destes, foram selecionados quatro animais com hérnia escrotal e quatro do grupo controle, que foram selecionados de famílias sem histórico de ocorrência de hérnias nas últimas 3 gerações. Foi realizada a necropsia dos animais, para a avaliação geral de possíveis problemas e características adicionais que poderiam interferir na expressão gênica no tecido avaliado, bem como para a correta caracterização do fenótipo. Na necropsia, foram coletadas amostras teciduais do anel herniário e não herniário dos suínos, que foram armazenadas a -80°C para posterior extração de RNA mensageiro.

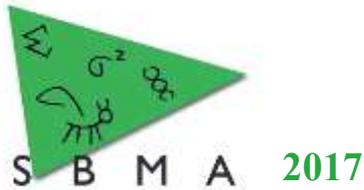
A extração do RNA total foi realizada utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade do RNA total foram avaliadas pela quantificação em espectrofotômetro Biodrop, em gel de agarose 1% e no equipamento Bioanalyzer Agilent 2100. Foram consideradas apenas amostras que apresentaram valores de RIN (número de integridade de RNA) acima de 8. O preparo das bibliotecas para o sequenciamento foi realizado com o kit TruSeq Total Stranded Sample Preparation (Illumina). O sequenciamento foi realizado no equipamento HiSeq 2500 (Illumina) no Laboratório Multiusuário da FAPESP na ESALQ-USP, seguindo o protocolo paired-end (2 x 100 bp).

As sequências geradas passaram pelo processo de controle de qualidade no software SeqClean (<https://github.com/ibest/seqclean>) e, posteriormente, foram mapeadas no genoma referência do suíno (Sus Scrofa, montagem 10.2) com o software BWA-MEM (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). A expressão diferencial dos genes foi analisada utilizando o programa R com o pacote EdgeR (<http://bioconductor.org/packages/edgeR/>). Os genes DE foram selecionados com base no False Discovery Rate ($\text{FDR} \leq 0,05$). Para uma visão geral das funções dos genes DE, a classificação funcional baseada nos termos de ontologia gênica (GO) foi realizada na base de dados PANTHER.

Resultados e Discussão

Com o sequenciamento do mRNA, foi possível gerar uma caracterização completa do transcriptoma do anel herniário e não herniário dos suínos. As bibliotecas de paired-end 2x100pb sequenciadas produziram em média 28 milhões de *reads*/amostra. Após a limpeza dos dados, 98,01% das *reads* foram mapeadas no genoma referência do suíno, compreendendo 13.035 genes expressos nestes tecidos. Destes, 644 foram DE entre suínos normais e herniados, utilizando o critério de $\text{FDR} \leq 0,05$. Aproximadamente, 72% dos genes foram menos expressos no grupo afetado com hérnias, indicando que níveis baixos de mRNA desses genes podem estar associados à ocorrência da hérnia escrotal em suínos.

Fatores anatômicos, como o canal inguinal amplo, desbalanceamento das proporções de colágenos ou a não obliteração do *processus vaginalis* são considerados predisponentes a hérnia escrotal (Beck et al., 2006). Na análise de GO, muitos dos genes DE foram agrupados nesses processos. Considerando a função molecular, destacaram-se as funções de sinalização, agrupando genes relacionados com a sinalização de íons de cálcio, e, entre estas, pode-se destacar genes pertencentes às famílias das troponinas e miosinas. Sabe-se que a falta de íons Ca^{+2} pode inibir a apoptose do músculo liso, ressaltando que a apoptose deste tecido é um dos principais fatores responsáveis pela obliteração do *processus vaginalis*, que quando não obliterado pode ocasionar a hérnia escrotal (Tanyel et al., 2002). Analisando a categoria da ontologia gênica dos processos biológicos, destacam-se os processos celulares, metabólicos e de desenvolvimento. Entre os genes envolvidos nesses processos, destacam-se, *ADAM12* e *UBE2L6*, que são anotados como responsáveis pela ocorrência de apoptose. No presente estudo, estes



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

genes foram mais expressos em animais herniados. Além disso, nessa mesma categoria, os genes *FHLIC* e *FAIM2* foram menos expressos nos animais acometidos com hérnia. Estes são classificados como reguladores negativos do processo de apoptose, podendo interromper, impedir ou reduzir a frequência do processo apoptótico. Tais genes supracitados podem interferir na apoptose do músculo liso e, consequentemente, na não obliteração do *processus vaginalis*, tornando os animais mais propensos a ocorrência de hérnias.

Uma das características que pode ocasionar a hérnia escrotal é a fraqueza da região inguino-abdominal, possivelmente devido à alteração das proporções entre diferentes tipos de colágeno (Zhao et al., 2009). Dentre os genes DE, alguns são potencialmente associados a essa condição como *HOXA1*, *MMP1* e os diversos genes da família de colágeno. Genes da família *HOX* (homeobox) e *MMPs* (metaloproteases) participam do metabolismo do colágeno e possivelmente estão relacionados à fragilidade do tecido da parede inguinal. Neste trabalho, *HOXA1* e *MMP1* foram menos expressos em animais afetados com hérnia escrotal quando comparados com animais controle, indicando possível associação com a manifestação dessa patologia. Embora estes genes ainda não tenham sido associados com hérnias, dois genes destas famílias, *HOXA10* e *MMP2* já foram considerados candidatos para ocorrência de hérnias (Zhao et al., 2009). Além destes, 9 genes da família dos colágenos foram DE, sendo 7 deles menos expressos e dois mais expressos no grupo afetado em relação ao grupo controle, sugerindo que a variações na expressão desses genes nos animais afetados pode alterar a proporção de colágeno no tecido, diminuir a resistência e aumentar a flexibilidade do tecido, favorecendo o aparecimento da hérnia escrotal. Adicionalmente, observou-se maior expressão do gene *GUSB* em animais acometidos com hérnia escrotal. O *GUSB* é considerado um gene candidato funcional para essa patologia devido ao seu envolvimento na degradação do hialurano do tecido gubernacular após a descida dos testículos (Beck et al., 2006). Isso sugere que nos animais afetados ocorre um aumento na degradação do hialurano e possível alargamento do anel inguinal, o qual permaneceria aberto, causando hérnia.

Conclusão

Um conjunto de genes diferencialmente expressos foi identificado com importantes funções nos principais processos anatômicos e fisiológicos predisponentes a ocorrência de hérnia escrotal no suíno. O maior conhecimento desses genes pode ajudar a decifrar a arquitetura genética dessa doença congênita, em consequência, será possível elaborar novas estratégias nos programas de melhoramento genético para reduzir a incidência de hérnia escrotal na suinocultura.

Agradecimentos

Este projeto foi financiado pelo CNPq, processo número 476146/2013-5. Os autores agradecem Alexandre L. Tessmann pela assistência técnica e a Fapesb pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor.

Literatura citada

- BECK, J.; BORNEMANN-KOLATZKI, K.; KNORR, C.; TAEUBERT, H.; & BRENIG, B. Molecular characterization and exclusion of porcine GUSB as a candidate gene for congenital hernia inguinalis/scrotalis. **BMC Veterinary Research**, v. 2, p. 1-9, 2006.
- CUTLER R.S.; FAHY V.A.; CRONIN G.M.; SPICER E.M. Prewaning mortality. In STRAW B.E; ZIMMERMAN J.J.; D'ALLIARE S.; TAYLOR D.J. (ed.) Diseases of Swine, 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 2006, p. 1005–1006.
- GRINDFLEK, E.; MOE, M.; TAUBERT, H.; SIMIANER, H.; LIEN, S.; & MOEN, T. Genome-wide linkage analysis of inguinal hernia in pigs using affected sib pairs. **BMC Genetics**, v. 7, p. 1-12, 2006.
- IBGE. (ed.) **Produção da Pecuária Municipal 2015**. Rio de Janeiro, RJ:IBGE, 2015, 49p.
- TANYEL, F. C.; ERDEM, S.; BÜYÜKPAMUKÇU, N.; & TAN, E. Smooth muscle within incomplete obliterations of processus vaginalis lacks apoptotic nuclei. **Urologia internationalis**, v. 69, p. 42-45, 2002.
- ZHAO, X.; DU, Z. Q.; VUKASINOVIC, N.; RODRIGUEZ, F.; CLUTTER, A. C.; & ROTHSCHILD, M. F. Association of HOXA10, ZFP2, and MMP2 genes with scrotal hernias evaluated via biological candidate gene analyses in pigs. **American journal of veterinary research**, v. 70, p. 1006-1012, 2009.