

XIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Salvador, BA – 17 e 18 de junho de 2019

Descobertas de variantes envolvidas na ocorrência de hérnia escrotal em suínos pela análise do exoma

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, 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. Endereço atual: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus Sertão, Sertão, RS, 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: Hérnias escrotais em suínos são preocupantes para a indústria suinícola devido a perdas econômicas significativas e ao impacto negativo no bem-estar animal. A aplicação de chips de SNPs não oferece a oportunidade de expandir os estudos de associação para variantes de DNA não incluídas no chip, nem para descobrir novas variantes. O sequenciamento de éxons é um método útil e poderoso para a descoberta de variantes em regiões codificantes. Nessa perspectiva, objetivou-se, através do sequenciamento do exoma, prospectar variantes associadas ao acometimento da hérnia escrotal em suínos. Foram utilizados 8 suínos da raça Landrace (4 normais e 4 com hérnia escrotal) para descoberta de novas variantes por meio da ferramenta GATK. Aproximadamente 479 mil variantes foram encontradas entre as amostras avaliadas. Destas, 676 mutações foram diferentes entre os animais dos dois grupos sendo identificadas em 154 genes. As mutações localizadas nos genes *NFKBIA*, *TAK1* e *ADAMTS19* indicam que estes genes são possíveis candidatos a ocorrência hérnias escrotais em suínos.

Palavras-chave: doenças congênitas, sequenciamento, *Sus scrofa*.

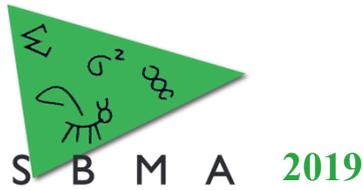
Discovery of variants involved in the occurrence of scrotal hernia in pigs using exome analysis

Abstract: Scrotal hernias in pigs are a concern to the pig industry due to significant economic losses and the negative impact on animal welfare. The application of SNP panels does not offer the opportunity to expand the association studies for DNA variants not included in the chip, nor to discover new variants. Exon sequencing is a useful and powerful method for the discovery of variants in coding regions. From this perspective, the objective of this work was to elucidate possible new variants associated with the involvement of scrotal hernia in pigs through the exome sequencing. Eight Landrace pigs (4 normal and 4 affected with scrotal hernia) were used for variant discovery using the GATK tool. Approximately 479 thousand variants were found among the evaluated samples. From those, 676 mutations were different between groups and were identified in 154 genes. Mutations located in the *NFKBIA*, *TAK1* and *ADAMTS19* genes indicate that those are possible candidates for the occurrence of scrotal hernias in pigs.

Keywords: congenital diseases, sequencing, *Sus scrofa*.

Introdução

A hérnia escrotal é uma das doenças congênitas importantes que acometem suínos comerciais. Esta condição ocorre quando parte do conteúdo abdominal passa para o saco escrotal. Os animais afetados possuem índices zootécnicos reduzidos, bem-estar animal comprometido, alta mortalidade e elevada frequência de condenações no abate. Assim, animais herniados exigem cuidados adicionais com a saúde e possuem valor de venda menor, causando perdas econômicas significativas para o setor suinícola. Estimativas de herdabilidade moderadas (0,26) já foram relatadas (Sevillano et al., 2015). Entretanto, os ganhos genéticos obtidos com a seleção não vêm sendo satisfatórios para a eliminação deste problema nos plantéis. Alguns estudos identificaram regiões genômicas e genes candidatos associados a esse defeito (Sevillano et al., 2015; Zhao et al., 2009). Embora esses estudos tenham fornecido informações importantes para o melhoramento animal, a etiologia desse problema ainda não foi evidenciada.



XIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Salvador, BA – 17 e 18 de junho de 2019

Painéis de SNPs de alta densidade são uma ferramenta poderosa para estudos de associação, além de serem relativamente baratas e fáceis de usar. No entanto, a aplicação dessas plataformas não oferece a oportunidade de expandir os estudos de associação para variantes de DNA não incluídas no painel, nem para descobrir novas variantes. O sequenciamento de éxons é um método útil e poderoso para a descoberta de variantes em regiões codificantes, possuindo precisão para identificar mutações raras e comuns, possibilitando a prospecção de genes candidatos para doenças importantes (Guo et al., 2012). Nessa perspectiva, objetivou-se, através do sequenciamento do exoma, descobrir variantes potencialmente associadas ao acometimento da hérnia escrotal em suínos.

Material e Métodos

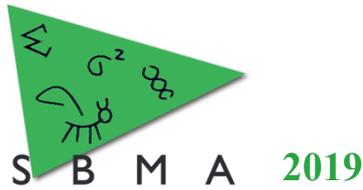
Para a extração do DNA genômico foram coletadas amostras do tecido da orelha de oito suínos machos da raça Landrace, com aproximadamente 60 dias de idade, provenientes de uma mesma granja núcleo. Destes, quatro animais eram acometidos com hérnia escrotal e quatro pertenciam ao grupo controle, os quais foram selecionados a partir de famílias sem histórico de ocorrência de hérnias nas últimas 3 gerações. O DNA foi extraído utilizando o kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies), segundo as recomendações do fabricante. A quantificação, qualidade e integridade do DNA total foram avaliadas em equipamento Biodrop (Biodrop). Para o preparo das bibliotecas de sequenciamento de DNA exômico, aproximadamente 1 µg de DNA total foi fragmentado em sonicador Bioruptor (Diagenode). Após a fragmentação, o kit de preparo da biblioteca exômica de suínos SeqCap EZ Library SR (NimbleGen/Roche) foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as bibliotecas foram quantificadas por qPCR e enviadas para sequenciamento em equipamento HiSeq 2500 (Illumina) no Centro de Genômica Funcional da ESALQ/USP. O sequenciamento realizado foi do tipo paired-end (2x100 pb). As sequências geradas passaram pelo processo de controle de qualidade no software SeqyClean (<https://github.com/ibest/seqyclean>) e, posteriormente, foram mapeadas no genoma referência do suíno (*Sus Scrofa*, montagem 11.1) com o software BWA-MEM (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). A descoberta das variantes foi realizada com a ferramenta Genome Analysis Tool Kit (GATK) (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>). A anotação das variantes encontradas foi realizada utilizando a ferramenta Variant Effect Predictor, disponível na base de dados do Ensembl versão 92. Foram selecionadas variantes que possuíam genótipos diferentes entre os grupos e suas funções e ontologias gênicas foram verificadas na plataforma DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>).

Resultados e Discussão

As bibliotecas sequenciadas produziram em média 31,4 milhões de *reads*/amostra. Após o controle de qualidade, 99,85% das *reads* foram mapeadas no genoma referência do suíno. Aproximadamente, 479 mil variantes totais foram encontradas entre as amostras avaliadas, independente dos grupos estudados. Considerando apenas as variantes diferentes entre os dois grupos (normal e afetado), 676 mutações foram identificadas, as quais estão localizadas em 154 genes. Do total de variantes, 577 já haviam sido descritas no dbSNP (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi) e 99 foram identificados pela primeira vez neste estudo. Dos SNPs identificados, 53% estavam localizados em regiões intrônicas e 14% em regiões exômicas. Apesar de se esperar apenas a presença de exons, outras regiões podem ser sequenciadas devido à similaridade das sondas e também a atualizações da anotação do genoma (Guo et al., 2012).

Variantes foram identificadas em genes que participam da obliteração do processo vaginal e apoptose do músculo liso, os quais estão relacionados com hérnia escrotal (Sevillano et al., 2015; Zhao et al., 2009). Dentre elas, o SNP rs340792589 (A>T) no SSC7, no íntron 5 do gene *NFKBIA* (Nuclear Factor Kappa-B Inhibitor Alpha), pode estar associado a hérnia escrotal. Este gene é responsável pela produção da proteína IκBα, a qual é inibidora da atividade do gene *NFKB*. O gene *NFKB* é responsável por suprimir as cascatas apoptóticas celulares (Spink et al., 2006). Dessa forma, variantes no *NFKBIA* podem afetar a expressão do gene, reduzindo os níveis de IκBα, apoptose e, assim, favorecer a não obliteração do processo vaginal, predispondo os animais à hérnia escrotal.

Outra variante (rs80923458) foi encontrada na região 5'UTR do gene *TABI* (TAK1-Binding Protein 1), no SSC5, também relacionado ao processo de apoptose. Este gene é essencial para a ativação do gene *TAK1* (factor-β-activated kinase 1) em resposta ao estresse osmótico, que por sua vez possui a função de



XIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Salvador, BA – 17 e 18 de junho de 2019

regulador central da apoptose celular, sendo ativado através de um conjunto diversificado de estímulos intra e extracelulares (Mihalyet al., 2014).

Além da não obliteração do processo vaginal, a fraqueza da região ínguino-abdominal é outro processo fisiológico que pode ocasionar hérnia escrotal, possivelmente devido à alteração das proporções entre diferentes tipos de colágeno (Zhao et al., 2009). Algumas das variantes identificadas neste estudo estão localizadas em genes que participam do metabolismo do colágeno e possivelmente estão relacionados a fragilidade do anel inguinal. Neste trabalho, a variante rs345457300 no SSC2, localizada no gene *ADAMTS19* (ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 19), pode indicar possível associação com a manifestação dessa patologia. Embora este gene possua função pouco conhecida, pertence à família *ADAMTS*, que codifica proteínas que participam da manutenção da matriz extracelular por meio da clivagem de pró-colágeno e proteoglicanos (Demircan et al., 2014). Assim, variantes podem alterar a expressão gênica nos animais afetados, prejudicando a proporção de colágeno, diminuindo a resistência e aumentando a flexibilidade do tecido, favorecendo o aparecimento da hérnia escrotal.

Conclusão

Um conjunto de variantes foi identificado a partir do sequenciamento exômico de suínos normais e afetados com hérnia escrotal. Algumas variantes estão localizadas em genes com funções nos principais processos anatômicos e fisiológicos que predisõem o acometimento de hérnia em suínos e outras espécies. As mutações localizadas nos genes *NFKBIA*, *TAK1* e *ADAMTS19* são consideradas possíveis candidatas para futuros estudos relacionados a hérnia escrotal em suínos.

Agradecimentos

Este projeto foi financiado pelo CNPq, processo número 476146/2013-5. Os autores agradecem a Alexandre L. Tessmann pela assistência técnica e a Fapesb pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor. Mônica C. Ledur e Luiz L. Coutinho são bolsistas de produtividade do CNPq.

Literatura citada

- Demircan, K., Cömertoğlu, İ., Akyol, S., Yiğitoğlu, B. N., & Sarıkaya, E. 2014. A new biological marker candidate in female reproductive system diseases: Matrix metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS). **Journal of the Turkish German Gynecology Association**, 15, 250–255.
- Guo, Y., Long, J., He, J., Li, C. I., Cai, Q., Shu, X. O., Zheng, W. & Li, C. 2012. Exome sequencing generates high quality data in non-target regions. **BMC genomics**, 13, 194.
- Mihaly, S. R.; Ninomiya-Tsuji, J.; Morioka, S. 2014. TAK1 control of cell death. **Cell Death & Differentiation**, 21, 1667–1676.
- Sevillano, C. A., Lopes, M. S., Harlizius, B., Hanenberg, E. H., Knol, E. F., & Bastiaansen, J. W. 2015. Genome-wide association study using deregressed breeding values for cryptorchidism and scrotal/inguinal hernia in two pig lines. **Genetics, selection, evolution : GSE**, 47, 18.
- Spink, C. F., Gray, L. C., Davies, F. E., Morgan, G. J., & Bidwell, J. L. 2006. Haplotypic structure across the $I\kappa B\alpha$ gene (*NFKBIA*) and association with multiple myeloma. **Cancer Letters**, 246, 92–99.
- Zhao, X., Du, Z. Q., Vukasinovic, N., Rodriguez, F., Clutter, A. C., & Rothschild, M. F. 2009. Association of *HOXA10*, *ZFPM*, and *MMP2* genes with scrotal hernias evaluated via biological candidate gene analyses in pigs. **American Journal of Veterinary Research**, 70, 1006–1012.