

**Análise integrada do transcriptoma e exoma revela novos genes relacionados ao acometimento de hérnia escrotal em suínos**

Gabrieli de Souza Romano<sup>1\*</sup>, Adriana Mércia Guaratini Ibelli<sup>2</sup>, Jane de Oliveira Peixoto<sup>2</sup>, Maurício Egídio Cantão<sup>2</sup>, Marcos Antonio Zanella Morés<sup>2</sup>, Luiz Lehmann Coutinho<sup>4</sup>, Victor Breno Pedrosa<sup>3</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>Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo/ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil.

\*Autor correspondente: [gabisouza\\_romano@yahoo.com.br](mailto:gabisouza_romano@yahoo.com.br)

**Resumo:** As hérnias escrotais são anomalias congênitas de grande importância econômica para a indústria suinícola, devido ao impacto negativo nos índices zootécnicos e bem-estar animal. Por se tratar de uma característica quantitativa, os mecanismos genéticos para expressão do fenótipo são complexos. Desta forma, objetivou-se por meio da análise do transcriptoma e do exoma, identificar possíveis novas mutações e genes envolvidos na ocorrência de hérnia escrotal de suínos. Foram utilizados 8 suínos da raça Landrace (4 normais e 4 com hérnia escrotal) para o sequenciamento do exoma e do RNA mensageiro. Para a descoberta de novas variantes utilizou-se a ferramenta GATK. Os genes diferencialmente expressos foram obtidos utilizando-se o pacote EdgeR, com base no *False Discovery Rate* ( $FDR \leq 0,05$ ). Estavam presentes em ambos, no transcriptoma e no exoma, 80 SNPs pertencentes a 35 genes diferentes, dos quais 3 apresentaram diferenças de expressão entre os grupos. As mutações localizadas nos genes *MYRF*, *ADAMTS19* e *FBLN5* foram consideradas possíveis candidatas para predisposição de hérnia escrotal em suínos.

**Palavras-chave:** genes diferencialmente expressos, mutação, *Sus scrofa*

**Integrated transcriptome and exome analysis reveals new genes involvement in the occurrence of scrotal hernia in pigs**

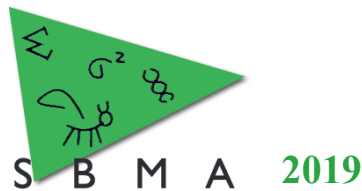
**Abstract:** Scrotal hernias are congenital anomalies with high economic importance for the pig production, due to the negative impact on performance and animal welfare. As a quantitative trait, the genetic mechanisms involved in the expression of the phenotype are complex. Therefore, we aimed to identify possible new mutations and genes involved in the occurrence of scrotal hernia of pigs through the transcriptome and exome analyses. Eight Landrace pigs (4 normal and 4 with scrotal hernia) were used for the exome and messenger RNA sequencing. For the discovery of new variants, the GATK tool was used. Differentially expressed (DE) genes were obtained using the EdgeR package, based on the False Discovery Rate ( $FDR \leq 0.05$ ). A total of 80 variants belonging to 35 different genes were present in both the transcriptome and exome, of which 3 were DE between the groups. Mutations located in the *MYRF*, *ADAMTS19* and *FBLN5* genes were considered possible candidates for the predisposition of scrotal hernia in pigs.

**Keywords:** differentially expressed genes, mutation, *Sus scrofa*

**Introdução**

A incidência de algumas doenças congênitas na suinocultura tem ocasionado significativas perdas econômicas e impacto negativo sobre o bem-estar animal. A hérnia escrotal, caracterizada pela presença do conteúdo abdominal no saco escrotal, é uma doença congênita comum em suínos. A falha da obliteração do processo vaginal, desbalanceamento entre os diferentes tipos de colágenos e fraqueza da parede inguinal podem promover o desenvolvimento de hérnia escrotal em suínos (Zhao et al., 2009).

Regiões genômicas, genes candidatos e polimorfismos têm sido associados a hérnia escrotal (Zhao et al., 2009, Manalaysay et al., 2017). Entretanto, por se tratar de uma característica complexa, muitos genes podem influenciar este fenótipo, dificultando a elucidação dos mecanismos genéticos envolvidos na



sua manifestação. Estudos de associação genômica vêm sendo aplicados como importante metodologia para o esclarecimento da ocorrência de doenças genéticas, todavia, possibilita associar apenas mutações incluídas no painel de SNPs, não contemplando a descoberta de novas variantes. O sequenciamento do RNA mensageiro e do exoma são excelentes abordagens para a descoberta de novas mutações em regiões codificadoras do genoma. Desta forma, objetivou-se por meio da análise conjunta do transcriptoma e do exoma, identificar possíveis novas mutações e genes envolvidos na ocorrência de hérnia escrotal em suínos.

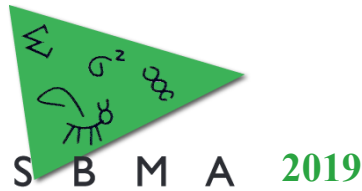
#### Material e Métodos

Foram utilizados oito suínos machos da raça Landrace, com aproximadamente 60 dias de idade, provenientes da mesma granja núcleo. Destes, quatro animais apresentavam hérnia escrotal e quatro eram normais e foram selecionados de famílias sem histórico de ocorrência de hérnias nas últimas 3 gerações. Para a extração do DNA genômico e do RNA, foram coletadas amostras do tecido da orelha e do anel inguinal, respectivamente. O DNA foi extraído utilizando o kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies) segundo as recomendações do fabricante. A extração do RNA total foi realizada utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação, qualidade e integridade do DNA total, bem como do RNA total, foram avaliadas em equipamento Biodrop. A integridade das amostras de RNA também foi avaliada no equipamento Bioanalyzer (Agilent 2100) e foram consideradas apenas amostras que apresentaram valores de RIN (número de integridade de RNA) acima de 8. Após a fragmentação do DNA em sonicador Bioruptor, para preparo das bibliotecas de sequenciamento de DNA exômico, o kit SeqCap EZ Library SR (NimbleGen/Roche) foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. O preparo das bibliotecas para o sequenciamento do RNA foi realizado com o kit TruSeq Total Stranded Sample Preparation (Illumina). Em seguida, ambas as bibliotecas foram quantificadas por qPCR e enviadas para sequenciamento em equipamento HiSeq 2500 (Illumina) no Centro de Genômica Funcional da ESALQ/USP, seguindo o protocolo paired-end (2 x 100 pb). 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 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 (<http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>), disponível na base de dados do Ensembl. Foram selecionadas variantes que possuíam o mesmo genótipo dentro de grupo e genótipos diferentes entre os grupos. A expressão diferencial (DE) dos genes foi analisada utilizando o programa EdgeR (<http://bioconductor.org/packages/edgeR/>). Os genes DE foram selecionados com base no nível de *False Discovery Rate* ( $FDR \leq 0,05$ ).

#### Resultados e Discussão

Com o sequenciamento do RNAm e do exoma, foi possível caracterizar o transcriptoma do anel herniário e não herniário dos suínos, bem como o exoma desses animais. Considerando apenas as mutações que diferiram entre os grupos afetado e controle, foram descobertas 167 e 676 variantes no transcriptoma e no exoma, respectivamente. Dentre essas, 80 variantes estavam presentes em ambas as abordagens (transcriptoma e exoma), as quais foram mapeadas em 35 genes diferentes. No entanto, apenas 3 destes 35 genes apresentaram diferença significativa ( $FDR < 0,05$ ) no perfil de expressão entre suínos herniados e normais, sendo eles: *MYRF* (Mielina Regulatory Factor), *ADAMTS19* (ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 19) e *FBLN5* (Fibulin 5).

Neste estudo, a variante rs712681004 (A>C), no gene *MYRF1* localizado no SSC2, foi encontrada tanto no estudo de sequenciamento exômico quanto no transcriptoma. Além disso, este gene foi mais expresso nos animais afetados com hérnia escrotal em relação ao grupo normal. Alguns estudos histopatológicos demonstraram que a bainha de mielina encontrada na região do anel inguinal é mais espessa em humanos herniados do que em relação a não herniados (Amato et al., 2011), o que poderia resultar em degeneração axonal (Carenini et al., 1997). Essa degeneração ocasiona o bloqueio do impulso nervoso aos feixes musculares, causando atrofia muscular, o que pode levar a perda de força contrátil que reduz a espessura da parede e enfraquece a parede abdominal na região inguinal (Amato et al., 2011).



Estes eventos combinados poderiam explicar parcialmente o enfraquecimento da região inguinal que predis põe os suínos a hérnia escrotal, de forma que a maior expressão do *MYRF1* poderia estar envolvida no desencadeamento destes processos.

Alterações nas proporções entre os diferentes tipos de colágenos também podem ocasionar fraqueza da região inguino-abdominal (Zhao et al., 2009). Foi encontrada outra variante (rs325977213, A>G) no gene *ADAMTS19* (SSC2), que foi menos expresso em suínos herniados. Apesar do gene *ADAMTS19* possuir função pouco conhecida, a família de proteínas *ADAMTS* participa da manutenção da matriz extracelular por meio de sua clivagem de pró-colágeno e proteoglicanos (Demircan et al., 2014). Assim, é possível que a menor expressão desse gene nos animais afetados possa alterar a proporção de colágeno no tecido, diminuindo a resistência e aumentando a flexibilidade do tecido, favorecendo o aparecimento da hérnia escrotal.

O SNP rs322378983 localizado no gene *FBLN5* (SSC7) apresentou genótipos diferentes entre os grupos herniados e controle. Este gene foi menos expresso nos suínos acometidos com hérnia escrotal. O gene *FBLN5* interage com proteínas da família *LOX* (Lysyl Oxidase) facilitando a agregação e reticulação de elastina para as microfibrilas (Pezzoli et al., 2018). A menor expressão deste gene pode prejudicar a formação de ligações cruzadas de colágeno/elastina por meio da atuação do *LOX* (Pezzoli et al., 2018), ocasionando a redução da resistência e a integridade estrutural, aumentando a flexibilidade do tecido, predispondo os animais a hérnia escrotal.

#### Conclusão

Um conjunto de variantes pertencentes ao transcriptoma e ao exoma de suínos normais e afetados com hérnia escrotal foi identificado. As mutações localizadas nos genes *MYRF*, *ADAMTS19* e *FBLN5*, em conjunto com a análise de expressão gênica, apontaram estes genes como fortes candidatos influenciando no desenvolvimento de hérnia escrotal de 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

- Amato, G., Ober, E., Romano, G., Salamone, G., Agrusa, A., Gulotta, G., & Bussani, R. 2011. Nerve degeneration in inguinal hernia specimens. **Hernia**, 15, 53–58.
- Carenini, S., Montag, D., Cremer, H., Schachner, M., & Martini, R. 1997. Absence of the myelin-associated glycoprotein (MAG) and the neural cell adhesion molecule (N-CAM) interferes with the maintenance, but not with the formation of peripheral myelin. **Cell and Tissue Research**, 287, 3–9.
- 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.
- Manalaysay, J. G., Antonio, N. D., Apilado, R. L. R., Bambico, J. F., & Mingala, C. N. 2017. Screening of BCL-2 associated X protein gene polymorphism associated with scrotal hernia in domesticated swine using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 30, 262–266.
- Pezzoli, D., Di Paolo, J., Kumra, H., Fois, G., Candiani, G., Reinhardt, D. P., & Mantovani, D. 2018. Fibronectin promotes elastin deposition, elasticity and mechanical strength in cellularised collagen-based scaffolds. **Biomaterials**, 180, 130-142.
- Zhao, X., Du, Z. Q., Vukasinovic, N., Rodriguez, F., Clutter, A. C., & Rothschild, M. F. 2009. Association of HOXA10, ZFPM2, and MMP2 genes with scrotal hernias evaluated via biological candidate gene analyses in pigs. **American Journal of Veterinary Research**, 70, 1006–1012.