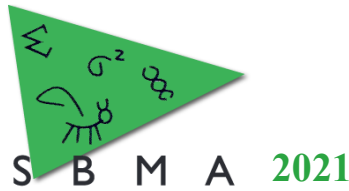


# XIV Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

18 a 19 de Outubro de 2021  
*On-line*





**Perfil de metilação diferencial em suínos normais e afetados com osteocondrose *latens***

Mariane S. Dal Pizzol<sup>1</sup>, Adriana M. G. Ibelli<sup>2,3</sup>, Leticia Alves Salmória<sup>3</sup>, Marcos Antônio Zanella Morés<sup>2</sup>, Jane de Oliveira Peixoto<sup>2,3</sup>, Igor Ricardo Savoldi<sup>1</sup>, Fábio Pertille<sup>4</sup>, Pilar Drummond Sampaio Corrêa Mariani<sup>4</sup>, Luiz Lehman Coutinho<sup>4</sup>, Mônica Corrêa Ledur<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UDESC/Oeste, Chapecó, SC, Brasil.

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

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Unicentro, Guarapuava, PR, Brasil.

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

\*Autor correspondente: [mari\\_spudeit@hotmail.com](mailto:mari_spudeit@hotmail.com)

**Resumo:** A osteocondrose (OC) acomete a cartilagem de animais ocasionando claudicação, sendo comum em animais de produção, causando prejuízos econômicos e ao bem-estar animal. Mecanismos epigenéticos foram relacionados com doenças locomotoras, mas ainda não se sabe se estão associados à OC. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de metilação entre animais normais e afetados com OC em seu estágio inicial. Para isso, foram utilizadas amostras de cartilagem de porcas normais e afetadas com OC *latens*, que foram submetidas ao preparo de bibliotecas de DNA metilado utilizando a técnica de MEDIP e em seguida sequenciadas (2x100bp). As sequências passaram por controle de qualidade, foram mapeadas no genoma suíno e a metilação diferencial e a anotação funcional foram realizadas. Foram identificados 71 genes em regiões diferencialmente metiladas entre os grupos, com funções ligadas a diversos processos biológicos, inclusive já foram relacionados com outras desordens ósseas, mas nunca foram associados com o desenvolvimento de OC. Entre os genes, destacam-se *SMOC2*, *ROR2* e *ABLIM1*, que já foram associados com a formação óssea, ossificação endocondral e anormalidades na formação esquelética e regulação da osteoclastogênese, respectivamente. Portanto, foram evidenciados genes candidatos com diferentes padrões de metilação entre animais normais e afetados com osteocondrose *latens* no genoma de suínos, que podem estar envolvidos no desencadeamento dessa condição em suínos.

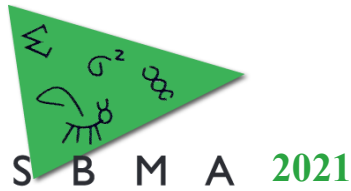
**Palavras-chave:** cartilagem, epigenética, problemas locomotores, sequenciamento de nova geração.

**Abstract:** Osteochondrosis (OC) affects the cartilage of animals, causing lameness, being very prevalent in farm animals, which causes economic and animal welfare losses. Epigenetic mechanisms have been linked to locomotor diseases, but are not yet known to be associated with OC. Thus, the aim of this work was to evaluate the methylation profile between normal and affected animals with OC in its initial stage. For this, cartilage samples from normal and OC *latens*-affected sows were used, which were subjected to DNA extraction and preparation of methylated DNA libraries using a MEDIP technique and then sequenced (2x100bp). The sequences underwent quality control, were mapped into the pig genome and differential methylation and functional annotation were performed. 71 genes were identified in the differentially methylated regions between the 2 studied groups. These genes were linked to several biological processes, and they have previously been related to other bone disorders, but they have never been associated with the development of OC. Among the genes identified, *SMOC2*, *ROR2* and *ABLIM1* can be highlighted, which have already been associated with bone formation, endochondral ossification and abnormalities in skeletal formation and regulation of osteoclastogenesis, respectively. Therefore, candidate genes with different methylation patterns were found in the swine genome between normal and osteochondrosis *latens*-affected sows, which may be involved in triggering this condition in swine.

**Keywords:** cartilage, epigenetics, locomotor problems, next generation sequencing.

### Introdução

A osteocondrose é uma desordem não inflamatória que ocorre na cartilagem epifisária de animais em fase de crescimento, causa uma alteração na diferenciação das células cartilaginosas, comprometendo a ossificação endocondral. Essa condição acomete diversas espécies, provoca claudicação e fraqueza nas



pernas desses animais (EKMAN;CARLSON, 1998). Na produção de suínos essa desordem prejudica o consumo de alimento e água, debilitando a saúde dos animais, causando perdas econômicas, assim como comprometendo o bem-estar animal. As lesões causadas pela osteocondrose podem ser classificadas em três estágios: 1) *latens*, de forma subclínica, estágio inicial, só é visível microscopicamente; 2) *manifesta*, quando existem falhas focais na cartilagem de ossificação endocondral, as quais são visíveis macroscopicamente e por exames radiográficos e 3) *dissecans*, quando ocorre fissura na cartilagem necrótica e possível fragmentação da cartilagem, causando inflamação, aumento do líquido sinovial e osteoartrose (ZIMMERMAN et al, 2012). A etiologia desse distúrbio não está totalmente esclarecida, mas existem estudos que apontam a genética como sendo um fator para a sua manifestação. Além disso, mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos no desencadeamento desta condição. O objetivo deste trabalho foi identificar regiões diferencialmente metiladas (DMRs) no genoma de suínos entre animais saudáveis e afetados com estágios iniciais de OC.

### Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de cartilagem articular distal do fêmur de animais da linhagem MS115, desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves, com composição genética Landrace, Large White e Pietran, das quais foram selecionadas 3 porcas normais e 3 afetadas com OC *latens*. Os animais tinham aproximadamente 150 dias de idade e foram originários da granja da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia/SC, BR). Foi realizada a extração do DNA e, em seguida, as bibliotecas para sequenciamento do DNA metilado foram preparadas por meio da técnica de imunoprecipitação de DNA metilado (MEDIP) e sequenciadas em equipamento Illumina HiSeq 2500 (2x100pb) no Centro de Genômica Funcional da ESALQ. As sequências foram submetidas à análise de controle de qualidade no programa Trimmomatic 0.38 (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) e mapeadas no genoma suíno (susScr11) disponível no UCSC Genome Browser utilizando o software BWA-MEM. A metilação diferencial foi obtida utilizando-se o pacote MedipsR no software R e as regiões diferencialmente metiladas (DMRs) foram consideradas significativas quando  $FDR < 0,05$ . A anotação funcional foi realizada nas ferramentas DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) e Biomart do Ensembl versão 104.

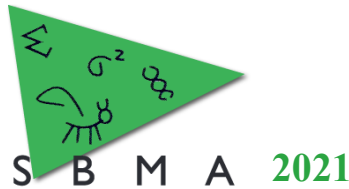
### Resultados e Discussão

Nesse trabalho foram encontradas 232 regiões diferencialmente metiladas (DMRs) entre suínos do grupo controle e o grupo afetado com OC *latens*. Nestas regiões, foram verificados 71 genes, dos quais 46 são conhecidos, enquanto os outros ainda não foram anotados no genoma dos suínos. De acordo com a anotação funcional dos genes relacionados com as DMRs identificadas, estes estão ligados a diversos processos biológicos, entre eles a regulação da matriz extracelular, ossificação e mecanismos ligados ao processo de ossificação endocondral. Dentre os genes em DMRs, pode-se destacar o *SPARC Related Modular Calcium Binding 2 (SMOC2)*, *Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2 (ROR2)* e *Actin Binding LIM Protein 1 (ABLIM1)*.

Muitos dos genes identificados ainda não foram relacionados diretamente com a OC, contudo alguns foram associados a outros distúrbios ósseos e malformações. O gene *SMOC2*, encontrado no cromossomo 1 dos suínos, está relacionado com a regulação da formação óssea, sendo que experimentalmente o *knockdown* desse gene inibiu a osteoblastogênese e prejudicou a formação endocondral dos ossos em ratos, sugerindo que o gene tem um papel importante na diferenciação e maturação dos osteoblastos (TAKAHATA et al., 2021). Este gene estava hipermetilado no grupo afetado indicando que este perfil pode estar associado a incorreta ossificação endocondral nas amostras afetadas.

Outro gene hipermetilado no grupo afetado neste trabalho, o *ROR2*, está ligado a angiogênese. Este gene está localizado no cromossomo 14 de suínos, é expresso na cartilagem em desenvolvimento, codificando a enzima tirosina quinase, que é essencial para o correto funcionamento dos condrocitos. O *ROR2* apresenta papel crítico na formação da cartilagem e quando silenciado em camundongos foi observado o desencadeamento de sérias anormalidades na formação esquelética, principalmente nos ossos de origem endocondral (DECHIARA et al, 2000).

O gene *ABLIM1*, hipometilado no grupo afetado, e também localizado no cromossomo 14, regula a osteoclastogênese através da modulação da expressão de outros genes que atuam na diferenciação dos



osteoclastos. A regulação negativa de *ABLIM1* também suprimiu a reabsorção óssea, indicando ser um dos responsáveis por regular diretamente a osteoclastogênese (JIN et al, 2018).

Desta forma, neste trabalho, foram encontradas regiões DMRs em genes relacionados a ossificação e angiogênese entre os grupos estudados, indicando que mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos na manifestação da osteocondrose em suínos. Estes resultados também contribuem para um melhor entendimento de problemas locomotores em outras espécies animais.

#### Conclusão

Foram evidenciados genes candidatos com diferentes padrões de metilação entre animais normais e afetados com osteocondrose *latens* no genoma de suínos, que podem estar envolvidos na manifestação dessa condição nesta e em outras espécies.

**Tabela 1- Genes em regiões diferencialmente metiladas entre animais normais e afetados com OC**

Cromossomo	Genes em Regiões Diferencialmente Metiladas (DMRs)
1	<i>SMOC2</i>
11	<i>SPATA13, FAM155A</i>
12	<i>NOS2</i>
13	<i>SLC4A7</i>
14	<i>ROR2, ABLIM1</i>
15	<i>GPM6A, RAMP1, MYO1B</i>
16	<i>SEMA5A, ADCY2</i>
18	<i>CTTNBP2, HIBADH, OSBPL3</i>
2	<i>FSTL4, PCDHGA4</i>
3	<i>SPTBN1, RADIL, ASB3, NCK2, SNX29, TVP23A, CYS1</i>
5	<i>PLXNC1</i>
6	<i>CLPTM1, LDLRAD4, ZFH3, NOLA, MANIC1, DNAJC6, FGGY, MAST2</i>
7	<i>HIVEP1, NRXN3, SLA-DRB1, GCLC</i>
8	<i>RASGEF1B, CCDC149, EVC2, STK32B, CLNK, LAP3, MED28, FAM184B</i>
9	<i>NTM</i>

#### Agradecimentos

Esse estudo foi financiado pelo projeto nº 480575-2013-4 do CNPq. Os autores MSDP e LAS agradecem a FAPESC e a CAPES, respectivamente, pela concessão de bolsa de estudos. MCL e LLC são bolsistas de produtividade do CNPq.

#### Literatura citada

- Baek, S. H., Kim, K., Yoon, K., Kim, T., Kim, S. 2017. Genome-wide association scans for idiopathic osteonecrosis of the femoral head in a Korean population. **Molecular Medicine Reports**, 15: 750-758.
- DeChiara, T. M., Kimble, R. B., Poueymirou, W. T., Rojas, J., Masiakowski, P., Valenzuela, D. M., & Yancopoulos, G. D. 2000. Ror2, encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. **Nature genetics**, 24(3), 271-274.
- Ekman, S., & Carlson, C. S. 1998. The pathophysiology of osteochondrosis. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, 28(1), 17-32.
- Jin, S. H., Kim, H., Gu, D. R., Park, K. H., Lee, Y. R., Choi, Y., & Lee, S. H. 2018. Actin-binding LIM protein 1 regulates receptor activator of NF-κB ligand-mediated osteoclast differentiation and motility. **BMB reports**, 51(7), 356.
- Takahata, Y., Hagino, H., Kimura, A., Urushizaki, M., Kobayashi, S., Wakamori, K & Nishimura, R. 2021. Smoc1 and Smoc2 regulate bone formation as novel downstream molecules of Runx2. **Research Square**.
- Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G. 2012. Disease of Swine. **WileyBlackwell**, 1008.