RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/11/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO DO PROTEOGLICANO AGRECANO E DO PADRÃO DE CITOCINAS ASSOCIADO AO NANISMO EM EQUINOS DA RAÇA MINI-HORSE NO BRASIL

ROBERTA MARTINS BASSO

Botucatu - SP
Novembro de 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

ESTUDO DO PROTEOGLICANO AGRECANO E DO PADRÃO DE CITOCINAS ASSOCIADO AO NANISMO EM EQUINOS DA RAÇA MINI-HORSE NO BRASIL

ROBERTA MARTINS BASSO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho

Botucatu, SP
Novembro de 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Basso, Roberta Martins.
Estudo do proteoglicano agrecano e do padrão de citocinas associado ao nanismo em equinos da raça Mini-Horse no Brasil / Roberta Martins Basso. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: José Paes de Oliveira Filho
Capes: 50501062

1. Cavalos - Doenças. 2. Nanismo. 3. Histopatologia. 4. Doenças hereditárias. 5. Proteômica. 6. Mutação (Biologia).

Palavras-chave: Condrodisplasia; Doença hereditária; Histopatologia; Mutação; Proteômica.

Nome do autor: Roberta Martins Basso

Título: ESTUDO DO PROTEOGLICANO AGRECANO E DO PADRÃO DE CITOCINAS ASSOCIADO AO NANISMO EM EQUINOS DA RAÇA MINI-HORSE NO BRASIL

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho
Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

_____
Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Membro
Departamento de Morfologia
IBB – UNESP – Botucatu

_____
Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 18 de novembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus familiares. Aos meus pais, Carla e Sérgio, que nunca mediram esforços para que eu estudasse e realizasse meus sonhos. Minha mãe que é meu exemplo, na vida pessoal e profissional e meu pai que sempre vibrou com cada conquista minha. Ao meu irmão Pedro, meu melhor amigo e companheiro para todos os momentos, não tenho palavras que expressem o quanto você é essencial para mim. Ao meu vô Roberto que me acolheu em Botucatu, juntamente com minha dinda Lisiane, que me inspirou para seguir a carreira de médica veterinária.

Ao professor e orientador José Filho, um exemplo de profissional e ser humano, obrigada por todas as contribuições neste projeto e em minha vida. Ao professor Alexandre, também meu orientador na vida acadêmica desde meu primeiro ano de faculdade.

Ao meu amigo Felipe, amigo que se tornou um irmão durante o decorrer do mestrado. Obrigada por todos os conselhos, por todos os desabafos, por estar ao meu lado nos meus piores e melhores momentos, enfim, por todo o crescimento que você me trouxe. Se sou uma pessoa melhor hoje devo boa parte a você.

Aos meus amigos Pedro, Amanda, Luna, Gisele, Grazy, Adriana, Matheus e Henrique que estavam sempre presentes em minha vida durante este trajeto, sendo de longe ou de perto. Em especial ao meu amigo Pedro que não mediu esforços para estar sempre por perto e me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho. Sou muito grata a todas as minhas amizades.

Aos residentes, ex-residentes e funcionários da Clínica de Grandes Animais por todo o auxílio neste projeto, troca de experiências e principalmente com os animais que foram encaminhados ao hospital.

Aos residentes, ex-residentes e funcionários do Laboratório Clínico e a professora Regina que sempre me receberam de braços abertos para conversas, desabafos ou confraternizações, na minha segunda casa.

Aos meus colegas de pós graduação, de laboratório principalmente, Lukas, Raíssa, Amanda, Júlia, Ana Luísa e em especial ao Danilo, colega de projeto e fundamental para que nossas ideias fossem colocadas em prática.

Ao Cadu, Priscila, Antônio, Patrícia, Lala e Marcos que me introduziram no mundo da proteômica, colaborando imensamente para que o experimento acontecesse. Em especial ao Cadu e a professora Renée por aceitarem participar e colaborar neste projeto.

Ao professor Sérgio, Wellerson e seus orientados, obrigada pela fundamental contribuição durante o experimento, doação de reagentes e permissão para uso de seus laboratórios.

A todos aqueles que dedicaram alguns minutos de suas vidas para conversas ou ajuda durante a realização deste projeto. Com certeza, vocês foram importantes para o meu crescimento.

Ao LNBio - Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, pelas análises realizadas.

Ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da FMVZ - Unesp - Botucatu/SP, pelo auxílio prestado durante o curso de mestrado.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp - Botucatu/SP, pelo apoio desta instituição para o desenvolvimento deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos para desenvolvimento do projeto (processo nº 2018/11365-3).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1 - Relative expression of cytokines and ACAN in cartilage of miniature horses in different groups.....24

Supplementary Table 1 - Primer sequences used for *D1, D2, D3*, D4* and *c.6465A>T ACAN* variants.....28

Supplementary Table 2 - Equine primer sets used for real-time quantitative PCR…….....…….…29

Supplementary Table 3 - Mean of body measurements obtained from miniature dwarf horses 1 day old with disproportionate dwarfism and horses without dwarfism (controls) 1 day old…….30

Supplementary Table 4 - Proteins detected in healthy adult equine (not miniature) articular cartilage by the shotgun technique……..30

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Esquema da cartilagem em condições fisiológicas (acima) e em condições inflamatórias (abaixo) com ação de citocinas e ativação das metaloproteinases.....14

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figure 1 - Clinical signs of dwarfism in miniature horses. (a) Shortened neck and bowed limbs, mainly the hind limbs. (b) Mandibular prognathism.....19

Figure 2 - Metatarsal bones of miniature horses of the same age (one day old). Upper: animal without dwarfism. Lower: dwarf animal.....22

Figure 3 - Histological images of the articular cartilage (a, b) from miniature horses. H&E. (a) One-day-old miniature horse without dwarfism (CG) with normal articular cartilage. Bar = 50 µm. (b) One-day-old miniature horse with dwarfism (DG) with articular cartilage showing severe lesions; note the absence of differentiated chondrocytes and the chondrocyte disorganization. Bar = 50 µm.....22

Figure 4 - (a) Mean (± SD) chemiluminescence intensity for aggrecan (bands at 100 kDa). (b) Representative Western blots of aggrecan (20 µg of protein/lane) and α-tubulin, which was used as a loading control for sample normalization.....23

Figure 5 – Aggrecan levels relative to α-tubulin levels as quantified by densitometric analysis of the bands. The grey bars represent the animals in the DG, and the black bars represent the animals in the CG.....23

Figure 6 - Box plots showing the relative expression of aggrecan in articular cartilage. The top bar is the maximum observed expression level, the bottom bar is the minimum observed expression level, the top of the box is the upper or third quartile, the bottom of the box is the lower or first quartile, and the middle bar is the median value. An asterisk (*) indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$).....24

Supplementary Figure1 - Multiple alignment of the sequence targeted by the primary antibody and the sequences of human and equine aggrecan

core proteins. An asterisk (*) represents at least one different amino acid…….....27

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAN Agrecano

BSA Bovine serum albumine, do inglês (Albumina sérica bovina)

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar

DNA Ácido desoxirribonucleico

DNAse Desoxirribonuclease

IgG Imunoglobulina G

IL Interleucina

KDa Kilo Dalton

MMP metaloproteinase

PBS Phosphate buffered saline, do inglês (Tampão fosfato salino)

qPCR Quantitative polymerase chain reaction, do inglês (Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real)

RIPA Radioimmunoprecipitation buffer, do inglês (tampão do ensaio de radioimunoprecipitação)

RNA Ácido ribonucleico

RNAm Ácido ribonucleico mensageiro

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, do inglês (eletroforese em gel de poliacrilamida - Sodium dodecil sulfato)

SNP Single nucleotide polymorphism, do inglês (Polimorfismo de base única)

TNF-α Tumor necrosis factor α, do inglês (Fator de necrose tumoral α)

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO I

1. Introdução..... 4
2. Revisão de literatura..... 6
   - 2.1 Raça Mini-Horse..... 6
   - 2.2 Nanismo..... 6
   - 2.3 O nanismo na raça Mini-Horse..... 9
   - 2.4 A cartilagem..... 9
   - 2.5 Placa epifisária..... 10
   - 2.6 Agrecano..... 11
   - 2.7 Interleucinas e a articulação..... 12

CAPÍTULO II – Trabalho Científico 15

- Simple Summary……..…16
- Abstract..... 16
- Introduction 17
- Materials and Methods..... 17
- Results..... 21
- Discussion…… 24
- Conclusions…… 27
- Supplementary materials 27
- Author Contributions……... 27
- Funding……. 27
- Acknowledgments…….. 27
- Conflicts of Interest…… 27
- References 32

CAPÍTULO III

- Discussão geral 35
- Conclusões gerais 39
- Bibliografia 40
- Anexos..... 47

BASSO, R. M. **Estudo do proteoglicano agrecano e do padrão de citocinas associado ao nanismo em equinos da raça Mini-Horse no Brasil** – SP, 2020. 34p. Exame geral de qualificação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

O nanismo é um distúrbio de desenvolvimento que acarreta em um crescimento anormal, podendo ser classificado como proporcional ou desproporcional, dependendo da sua fisiopatogenia. Na raça Mini-Horse, sabe-se que o nanismo desproporcional é de caráter autossômico recessivo e envolve o gene *aggrecan* (*ACAN*) presente no cromossomo 1. São observados crescimento fisário retardado em membros e costelas, crânio desproporcionalmente maior que o corpo e malformado e, membros, tronco e pescoço encurtados como principais sinais clínicos. Diante do grande impacto do nanismo na raça Mini-Horse, objetivou-se realizar o estudo histológico da cartilagem articular e placa epifisária de animais afetados desta raça, detectar e quantificar o proteoglicano agrecano na cartilagem articular através da técnica de *Western Blot* e correlacionar com a expressão gênica das principais citocinas pró inflamatórias (IL-1β, IL-6 e TNF-α). Para isso, foram selecionados 8 Mini-Horse anões (GA) e três Mini-Horse sem o fenótipo do nanismo (GC). A condrodisplasia foi encontrada apenas nos equinos anões (100%) quando comparado ao grupo controle, em diferentes graus e a expressão gênica do proteoglicano agrecano apresentou-se maior no grupo dos anões ($p = 0,0119$). A quantificação indireta por *Western blotting* do agrecano apresentou tendência de valores maiores dos equinos anões quando comparados ao GC. Em relação às citocinas, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos. Conclui-se que o agrecano é expresso nos equinos anões da raça Mini-Horse, porém, esta molécula defeituosa parece estar intimamente relacionada ao desenvolvimento da enfermidade na raça, devido aos achados histopatológicos na cartilagem articular e placa epifisária e os achados fenotípicos observados.

Palavras-chave: doença hereditária, mutação, condrodisplasia, histopatologia, proteômica.

BASSO, R. M. **Study of aggrecan proteoglycan and cytokine pattern associated with dwarfism in Mini-Horse breed in Brazil.** – SP, 2020. 34p. Exame geral de qualificação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Dwarfism is a developmental disorder leading to an extreme abnormal growth that can be classified as proportional or disproportional, depending on its pathophysiology. In the Mini-Horse breed it is known that disproportional dwarfism is autosomal recessive and involves the *aggrecan* gene (*ACAN*) in the chromosome 1. Delayed physeal growth in limbs and ribs, disproportionately large and malformed skull and shortened limbs, trunk and neck as main clinical signs are observed. With the great impact of dwarfism in the Mini-Horse breed, the aim was to perform the histological study of the articular cartilage and epiphyseal plate of affected animals from this breed, detect and quantify the aggrecan glycoprotein in cartilages using the Western Blot technique and correlate with the gene expression of the main pro inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6 and TNF-α). Eighteen dwarf Mini-Horse (DG) and five Mini-Horse without this phenotype (CG) were selected. Chondrodysplasia was observed only in dwarf horses (100%) when compared to the control group, in different degrees and the gene expression of the aggrecan proteoglycan was higher in the dwarf group ($p = 0.0119$). The indirect quantification by Western blotting of the aggrecan showed a tendency for higher values of the dwarf horses when compared to the CG. Regarding cytokines, no significant differences were detected between groups. It is concluded that aggrecan is expressed in Mini-Horse dwarf equines, however, this defective molecule seems to be closely related to the development of the disease in this breed, due to the histopathological findings in the articular cartilage and epiphyseal plaque and the phenotypic findings observed.

Key words: hereditary disease, mutation, chondrodysplasia, histopathology, proteomics.



CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As doenças genéticas, principalmente as hereditárias, em sua maioria contribuem para perdas econômicas de um rebanho, além do sofrimento animal que causam, e muitas vezes apresentam caráter degenerativo que impedem o desenvolvimento ideal. Portanto, a caracterização da doença e identificação não só dos animais com o fenótipo da doença, bem como de todo o rebanho, a fim de evitar a disseminação do alelo afetado através de cruzamentos não planejados e consequentemente animais afetados são fundamentais (TRYON et al., 2009).

O nanismo é um distúrbio de desenvolvimento que acarreta em um crescimento anormal, já relatado em humanos e em cães, roedores, bovinos e galinhas (LI et al*.,* 1993; WATANABE et al*.*, 1997; CAVANAGH et al., 2007; MARTINEZ et al*.*, 2007; TOMPSON et al*.,* 2009). Em equinos, esse fenótipo foi descrito nas raças Friesian, Pônei Shetland e Mini-Horse, envolvendo os genes *B4GALT7* e *ACAN* nas duas últimas raças. (BACK et al., 2008; WATANABE et al., 2014; METZGER et al., 2017; EBERTH et al., 2018).

Na raça Mini-Horse, a enfermidade possui caráter autossômico recessivo e esse padrão de herança favorece a ampla disseminação desta enfermidade no plantel, uma vez que animais carreadores da mutação (heterozigotos) não apresentam alterações clínicas**.** Diversas mutações foram encontradas em diferentes *éxons* do gene descrito, sendo cada uma associada a um fenótipo distinto (EBERTH, 2013).

Levando em consideração que o nanismo em equinos da raça Mini-Horse é condrodisplásico, esses animais apresentam alterações de conformação por deformidade, principalmente, em ossos longos. Estudos sobre os mecanismos que regulam o desenvolvimento dessas doenças, em especial as citocinas e a resposta das células do tecido ósseo frente a elas, são importantes para que ações específicas com o objetivo de amenizar os danos, quando presentes, sejam adotadas (SIMS e LORENZO, 2020).

Diante da importância da doença já relatada no Brasil (WATANABE et al., 2014; ANDRADE et al., 2020) e suas consequências para o animal afetado e para a criação da raça Mini-Horse no Brasil, este estudo objetivou caracterizar melhor a doença, através da avaliação do proteoglicano agrecano e

correlacionar com a expressão das principais citocinas pró inflamatórias em equinos da raça Mini-Horse no Brasil.

Conclusões gerais

Em resumo, foi quantificado o proteoglicano agrecano utilizando a técnica de *Western blotting* e qPCR e avaliamos a expressão gênicas das citocinas *IL-1β, IL-6 e TNF-α* por qPCR em potros da raça Mini-Horse clinicamente afetados com o nanismo. Até onde sabemos, este trabalho é o primeiro a descrever a avaliação do agrecano em cavalos anões. O agrecano é expresso nos equinos anões e é improvável que essa proteína apresente sua função fisiológica preservada, contribuindo assim para a condrodisplasia observada na cartilagem articular e os achados fenotípicos observados. O processo inflamatório na cartilagem mostrou variar entre os animais avaliados, provavelmente devido a displasia decorrente da mutação no gene *ACAN* ou de outro processo inflamatório não identificado. Os achados deste estudo contribuem para o entendimento da etiopatogenia do nanismo condrodisplásico em equinos Mini-Horse.

Bibliografia

ABCMH. Associação brasileira de criadores de Mini-Horse. “Mini-Horse”. Revisado em 06/11/2008. Disponível em: <http://www.minihorse.com.br/sua_ historia.htm>. Acesso em: 06 de fevereiro de 2020.

ANDRADE, D.G.A.; BASSO, R.M.; CASTIGLIONI, M.C.R.; SILVA, J.P.; MACHADO, V.M.V.; LAUFER-AMORIM, R.; BORGES, A.S.; OLIVEIRA-FILHO, J.P. Description of the D4/D4 genotype in Miniature horses with dwarfism. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 32, p. 99-102, 2020a.

ANDRADE, D.G.A.; BASSO, R.M.; MAGRO, A.J.; LAUFER-AMORIM, R.; BORGES, A.S.; OLIVEIRA-FILHO, J.P. Evaluation of a new variant in the aggrecan gene potentially associated with chondrodysplastic dwarfism in Miniature horses. *Scientific Reports*, v. 10, n. 15238, 2020b.

ARNER, E.C. Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Current Opinion in Pharmacology,* v. 2, n. 3, p. 322-329, 2002.

BACK, W.; VAN DER LUGT, J.J.; NIKKELS, P.G.J.; VAN DEN BELT, A.J.M.; VAN DER KOLK, J.H.; STOUT, T.A.E. Phenotypic diagnosis of dwarfism in six Friesian horses. *Equine Veterinary Journal*. v. 40, n. 3, p. 282-287, 2008.

BALLOCK, R.T.; O’KEEFE, R.J. The Biology of the Growth Plate. *The journal of bone and joint surgery*. v. 85-A, n. 4, 2003.

BATEMAN, J.F.; BOOT-HANDFORD, R.P.; LAMANDÉ, S.R. Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, p. 173–183. 2009.

BEEKMAN, B.; VERZIJL, N.; DE ROOS, J.A.D.M.; TEKOPPELE, J.M. Matrix degradation by chondrocytes cultured in alginate: IL-1β induces proteoglycan degradation and proMMP synthesis but does not result in collagen degradation. *Osteoarthritis and Cartilage,* v. 6, p. 330–340, 1998.

CAVANAGH, J.A.L.; TAMMEN, I.; WINDSOR, P.A.; BATEMAN, J.F.; SAVARIRAYAN, R.; NICHOLAS, F.W.; RAADSMA, H.W. Bulldog dwarfism in

Dexter cattle is caused by mutations in ACAN. *Mammalian Genome*. v. 18, p. 808–814, 2007.

DOEGE, K.J.; COULTER, S.N.; MEEK, L.M.; MASLEN, K.; WOOD, J.G. A Human-specific Polymorphism in the Coding Region of the Aggrecan Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 21, p. 13974–13979, 1997.

DOMOWICZ, M.S.; PIROK, E.W.; NOVAK, T.E.; SCHWARTZ, N.B. Role of the C-terminal G3 Domain in Sorting and Secretion of Aggrecan Core Protein and Ubiquitin-mediated Degradation of Accumulated Mutant Precursors. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 45, p. 35098–35105, 2000.

EBERTH J.; SWERCZAK T.; BAILEY E. Investigation of Dwarfism Among Miniature Horses using the Illumina Horse SNP50 Bead Chip. *Journal of Equine Veterinary Science*. v. 29, n. 5, p.315, 2009.

EBERTH, J. E. Chondrodysplasia-Like Dwarfism in the Miniature Horse. Theses and Dissertations - Veterinary Science. 11. 83p, 2013.

EBERTH, J.E.; GRAVES, K.T.; MACLEOD, J.N.; BAILEY, E. Multiple alleles of *ACAN* associated with chondrodysplastic dwarfism in Miniature horses. *Animal Genetics*, n. 49, p. 413-420, 2018.

FIGUEIREDO, M.D.; SALTER, C.E.; ANDRIETTI, A.L.P.; VANDENPLAS, M.L.; HURLEY, D.J.; MOORE, J.N. Validation of a reliable set of primer pairs for measuring gene expression by real-time quantitative RT-PCR in equine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, n. 131, p. 65–72, 2009.

GLEGHORN, L.; RAMESAR, R.; BEIGHTON, P.; WALLIS, G. A Mutation in the Variable Repeat Region of the Aggrecan Gene (AGC1) Causes a Form of Spondyloepiphyseal Dysplasia Associated with Severe, Premature Osteoarthritis. *American Journal of Human Genetics*. v. 77, p. 484–490, 2005.

HEINEGÅRD, D.; SAXNE, T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. v. 7, p. 50–56, 2011.

JIKKO, A.; WAKISAKA, T.; IWAMOTO, M.; HIRANUMA, H.; KATO, Y.; MAEDA, T.; FUJISHITA, M.; FUCHIHATA, H. Effects of interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures. *Cell Biology International*. v. 22, n. 9/10, p. 615–621, 1998.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KIANI, C.; CHEN, L.; WU, Y.J.; YEE, A.J.; YANG, B.B. Structure and function of aggrecan. *Cell Research.* v. 12, n. 1, p. 19-32, 2002.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*, v. 6, n. 62, 2005.

LEEGWATER, P.A.; VOS-LOOHUIS, M.; DUCRO, B.J.; BOEGHEIM, I.J.; VAN STEENBEEK, F.G.; NIJMAN, I.J.; MONROE, G.R.; BASTIAANSEN, J.W.M.; DIBBITS, B.W.; VAN DE GOOR, L.H.; HELLINGA, I.; BACK. W.; SCHURINK, A. Dwarfism with joint laxity in Friesian horses is associated with a splice site mutation in B4GALT7. *BMC Genomics*. v. 17, n. 839, 2016.

LI, H.; SCHWARTZ, N.B.; VERTELL. B.M. cDNA Cloning of Chick Cartilage Chondroitin Sulfate (Aggrecan) Core Protein and Identification of a Stop Codon in the Aggrecan Gene Associated with the Chondrodystrophy, Nanomelia. *The journal of biological chemistry*. v. 268, n. 31, p. 23504-23511,1993.

LOTZ, M.; GUERNE, P.A. Interleukin-6 Induces the Synthesis of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-l/Erythroid Potentiating Activity (TIMP- 1/EPA). *The Journal of Biological Chemistry*. v. 266, n. 4, p. 2017-2020, 1991.

MACKIE, E.J.; AHMED, Y.A.; TATARCZUCH, L.; CHEN, K.S.; MIRAMS, M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 40, p. 46-62, 2008.

MANKIN, H.J.; JOHNSON, M.E.; LIPPIELLO, L. Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteoarthritic Human Hips. *The Journal of Bone and Join: Surgery*, v. 63-A, n. 1, p. 131-139, 1981.

MARTÍNEZ, S.; FAJARDO, R.; VALDÉS, J.; ULLOA-ARVIZU, R.; ALONSO, R. Histopathologic study of long-bone growth plates confirms the basset hound as an osteochondrodysplastic breed. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. v. 71, p. 66–69, 2007.

METZGER, J.; GAST, A.C.; SCHRIMPF, R.; RAU, J.; EIKELBERG, D.; BEINEKE, A.; HELLIGE, M.; DISTL, O. Whole-genome sequencing reveals a potential causal mutation for dwarfism in the Miniature Shetland pony. *Mamm Genome*. v. 28, n. 3-4, p. 43-151, 2017.

OLIVEIRA FILHO, J.P.; BADIAL, P.R.; CUNHA, P.H.J.; CRUZ, T.F.; ARAÚRO JR., J.P.; DIVERS, T.J.; WINAND, N.J.; BORGES, A.S. Cloning, sequencing and expression analysis of the equine hepcidin gene by real-time PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 135, p. 34-42, 2010.

ORITA, S.; KOSHI, T.; MITSUKA, T.; MIYAGI, M.; INOUE, G.; ARAI, G.; ISHIKAWA, T.; HANAOKA, E.; YAMASHITA, K.; YAMASHITA, M.; EGUCHI, Y.; TOYONE, T.; TAKAHASHI, K.; OHTORI, S. Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee. *BMC Musculoskeletal Disorders*. v. 12, p. 144, 2011.

ORR, N.; BACK, W.; GU, J.; LEEGWATER, P.; GOVINDARAJAN, P.; CONROY, J.; DUCRO, B.; VAN ARENDONK, J.A.M.; MACHUGH, D.E.; ENNIS, S.; HILL, E.W.; BRAMA, P.A.J. Genome-wide SNP association–based localization of a dwarfism gene in Friesian dwarf horses. *Animal Genetics*, v. 41, n. 2, p., 2–7, 2010.

PAWLAK, E.; WANG, L.; JOHNSON, P.J.; NUOVO, G.; TAYE, A.; BELKNAP, J.K.; ALFANDARI, D.; BLACK, S.J. Distribution and processing of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4, aggrecan, versican, and hyaluronan in equine digital laminae. *American Journal of Veterinary Research*, v. 73, n. 7, 2012.

RAFATI, N.; ANDERSSON, L.S.; MIKKO, S.; FENG, C.; RAUDSEPP, T.; PETTERSSON, J.; JANECKA, J.; WATTLE, O.; AMEUR, A.; THYREEN, G.;

EBERTH, J.; HUDDLESTON, J.; MALIG, M.; BAILEY, E.; EICHLER, E.E.; DALIN, G.; CHOWDARY, B.; ANDERSSON, L.; LINDGREN, G.; RUBIN, C.J. Large deletions at the SHOX locus in the pseudo-autosomal region are associated with skeletal atavism in Shetland Ponies. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v.6, n.7, p.2213–2223, 2016.

RASHID, H.; CHEN, R.; HASSAN, Q.; JAVED, A. Dwarfism in homozygous Agc1CreERT mice is associated with decreased expression of aggrecan. *Genesis*, v. 55, e23070, 2017.

SHINGU, M.; MIYAUCHI, S.; NAGAI, Y.; YASUTAKE, C.; HORIE, K. The role of el-4 and il-6 in il-1-dependent cartilage matrix degradation. *British Journal of Rheumatology.* v. 34, p.101-106, 1995.

SIMS, N.; LORENZO, J.A. Local regulators of bone: Interleukin-1, tumor necrosis factor, interferons, the IL-6 family, and additional cytokines. In: BILEZIKIAN, J.; MARTIN, T.J.; CLEMENS, T.; ROSEN, T. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, 2000. Chap. 50, p. 1205-1246.

STÖVE, J.; HUCH, K.; GÜNTHER, K-P.; SCHARF, H-P. Interleukin-1ß Induces Different Gene Expression of Stromelysin, Aggrecan and Tumor-Necrosis-Factor-Stimulated Gene 6 in Human Osteoarthritic Chondrocytes in vitro. *Pathobiology*, v. 68, p. 144–149, 2000.

STRUCK, A.K; DIERKS, C.; BRAUN, M.; HELLIGE, M.; WAGNER, A.; OELMAIER, B.; BEINEKE, A.; METZGER, J.; DISTL, O. A recessive lethal chondrodysplasia in a miniature zebu family results from an insertion affecting the chondroitin sulfat domain of aggrecan. *BMC Genetics*, v. 19, n. 91, 2018.

TOMPSON, S.W.; MERRIMAN, B.; FUNARI, V.A.; FRESQUET, M.; LACHMAN, R.S.; RIMOIN, D.L.; NELSON, S.F.; BRIGGS, M.D.; COHN, D.H.; KRAKOW, D. A. Recessive Skeletal Dysplasia, SEMD Aggrecan Type, Results from a Missense Mutation Affecting the C-Type Lectin Domain of Aggrecan. *The American Journal of Human Genetics*. v. 84, p. 72–79, 2009.

TORTORELLA, M.D.; BURN, T.C.; PRATTA, M.A.; ABBASZADE, I.; HOLLIS, J.M.; LIU, R.; ROSENFELD, S.A.; COPELAND, R.A.; DECICCO, C.P.; WYNN,

R.; ROCKWELL, A.; YANG, F.; DUKE, J.L.; SOLOMON, K.; GEORGE, H.; BRUCKNER, R.; NAGASE, H.; ITOH, Y.; ELLIS, D.M.; ROSS, H.; WISWALL, B.H.; MURPHY, K.; HILLMAN JR., M.C.; HOLLIS, G.F.; NEWTON, R.C.; MAGOLDA, R.; TRZASKOS, J.M.; ARNER, E.C. Purification and Cloning of Aggrecanase-I: A Member of the ADAMTS Family of Proteins. *Science,* v. 284, p. 1664-1666, 1999.

TRYON, R.C.; PENEDO, M.C.T.; MCCUE, M.E.; VALBERG, S.J.; MICKELSON, J.R.; FAMULA, T.R.; WAGNER, M.L.; JACKSON, M.; HAMILTON, M.J. NOOTEBOOM, S.; BANNASCH, D.L. Evaluation of allele frequencies of inherited disease genes in subgroups of American Quarter Horses*. Journal of the American Veterinary Medical Association.* v. 234, n.1, p. 120–125, 2009.

TYSON, R.; GRAHAM, J.P.; COLAHAN, P.T.; BERRY, C.R. Skeletal Atavism In A Miniature Horse. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. v. 45, n. 4, p. 315-317, 2004.

VAN DER EERDEN, B.C.J.; KARPERIEN, M.; WIT, J.M. Systemic and Local Regulation of the Growth Plate. *Endocrine Reviews.* v. 24, n. 6, p. 782–801, 2003.

WANNER, J.P.; SUBBAIAH, R.; SKOMOROVSKA-PROKVOLIT, Y.; SHISHANI, Y.; BOILARD, E.; MOHAN, S.; GILLESPIE, R.; MIYAGI, M.; GOBEZIE, R. Proteomic profiling and functional characterization of early and late shoulder osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 15, R180, 2013.

WATANABE, H.; NAKATA, K.; KIMATA, K.; NAKANISHI, I.; YAMADA, Y. Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote cmd mice defective in aggrecan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 94, p. 6943–6947, 1997.

WATANABE, M.J.; ALONSO, J.M.; YAMADA, A.L.M.; RODRIGUES, K.A.; HUSSNI, C.A.; ALVES, A.L.G. Características fenotípicas do nanismo em pôneis neonatos: relato de casos. *Ars Veterinaria*, v.30, n.1, p.001-004, 2014.

WEISBRODE, S.E. Bone and joints. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. *Pathologic basis of veterinary disease*. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. Fourth edition. Chapter 16. p. 1041- 1105.

YOSHIDA, C.A.; KAWANE, T.; MORIISHI, T.; PURUSHOTHAMAN, A.; MIYAZAKI, T.; KOMORI, H.; MORI, M.; QIN, X.; HASHIMOTO, A.; SUGAHARA, K.; YAMANA, K.; TAKADA, K.; KOMORI, T. Overexpression of Galnt3 in Chondrocytes Resulted in Dwarfism Due to the Increase of Mucin-type O-Glycans and Reduction of Glycosaminoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 289, n. 38, p. 26584–26596, 2014.