

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 <i>D1</i> , <i>D2</i> , <i>D3*</i> , <i>D4</i> and <i>c.6465A>T ACAN</i> 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 μ m. (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 μ m.....22
- Figure 4 - (a) Mean ($\pm$ SD) chemiluminescence intensity for aggrecan (bands at 100 kDa). (b) Representative Western blots of aggrecan (20 μ g 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

RNA_m 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-1 β , 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-1 β , 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.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Raça Mini-Horse

A raça Mini-Horse tem origem a partir de várias outras raças como Shetland (originário do norte da Escócia), Welsh (oriundo do país de Gales), Miniature Horse (proveniente dos Estados Unidos) e a raça Brasileiro (raça nacional oriunda do cruzamento de pôneis de origem bretã, uruguaia e argentina), sendo este último o principal formador da raça em questão. A raça é conhecida pelo pequeno porte, musculatura evidente e proporcionalidade quando levado em consideração seu tamanho, fazendo com que seja utilizada para tração, sela ou estimação (ABCMH, 2008).

As diferenças no tamanho corporal dos cavalos são atributos levados em consideração para a classificação em diferentes raças. Pôneis e Mini-Horse diferem das demais raças pela estatura, sendo que os primeiros apresentam estatura maior (média 145 cm) que os equinos Mini-Horse, com no máximo 98 cm de altura na cernelha (EBERTH et al., 2009; METZGER et al., 2017). No entanto, a intensa seleção direcionada para certas características, como o pequeno porte, contribuiu para o aumento da ocorrência do nanismo (EBERTH, 2013).

2.2 Nanismo

O nanismo é um distúrbio de desenvolvimento que acarreta em um crescimento anormal com presença de deformidades anatômicas, já relatado em humanos (TOMPSON et al., 2009) e em algumas espécies como cães da raça Basset Hound (MARTINEZ et al., 2007), bovinos da raça Dexter (CAVANAGH et al., 2007), ratos (WATANABE et al., 1997) e galinhas (LI et al., 1993). O nanismo congênito é reconhecido há anos, porém apenas recentemente suas características fenotípicas e genéticas têm sido estudadas (BACK et al., 2008; EBERTH et al., 2013). Essa enfermidade pode ser classificada de duas formas distintas, proporcional e desproporcional, que abrangem vários fenótipos, descritos extensivamente em humanos (tendo como forma mais comum do nanismo desproporcional a acondroplasia) e em menor escala nas outras espécies.

Em equinos, essa anomalia foi descrita na raça Friesian, pônei Shetland e Mini-Horse, tendo essa última descrição fenotípica e genética (BACK et al., 2008; WATANABE et al., 2014; METZGER et al., 2017; EBERTH et al., 2018). As características mais expressivas em cavalos com nanismo são: crescimento fisário retardado em membros e costelas; crânio desproporcionalmente grande e malformado, por vezes com fenda palatina ou língua saliente; e membros, tronco e pescoço encurtados (BACK et al., 2008; WATANABE et al., 2014, EBERTH, 2013). Devido à elevada possibilidade de futuras complicações e perda da qualidade de vida muitos equinos anões são submetidos a eutanásia (WATANABE et al., 2014).

Cavalos de pequeno porte, como Mini-Horse e pôneis, que apresentam deformidades angulares nos membros devem ser avaliados para descartar atavismo esquelético, já descrito para mais de uma raça equina (TYSON et al., 2004). Essa enfermidade é caracterizada pela presença da ulna e fíbula completas que se estendem até as articulações do carpo e tarso, respectivamente, causando alterações na estrutura esquelética, promovendo a rotação dos membros e prejudicando a movimentação (TYSON et al., 2004; RAFATI et al., 2016). O atavismo esquelético possui padrão de herança autossômico recessivo e é causado por deleções no gene *short stature homeobox (SHOX)*, já indicado como essencial para o desenvolvimento ósseo em humanos (RAFATI et al., 2016).

Na raça Friesian, o nanismo foi caracterizado como uma doença autossômica recessiva, apresentando como fenótipo peito mais largo com estreitamento na junção costochondral, coluna alongada, membros anormalmente curtos e cabeça do mesmo tamanho de animais não afetados. Estes animais apresentaram-se 25% mais curtos e com 50% a menos do peso corporal quando comparados a animais da mesma raça e faixa etária. Análises microscópicas da junção costochondral mostram uma transição irregular da cartilagem para o osso, espessamento e desorganização das colunas de condrócitos, caracterizando uma osteocondrodysplasia (BACK et al., 2008). Além disso, as radiografias revelam uma metáfise displásica de metacarpos e metatarsos distais.

Posteriormente, Orr et al. (2010) indicaram mutações em três genes suspeitos (*ZNF346*, *COL23A1* e *B4GALT7*) como causadores do nanismo na raça Friesian, confirmado mais tarde por Leegwater et al. (2016), que sugeriram

que uma mutação no gene *B4GALT7*, identificada em equinos da mesma raça, levava ao fenótipo de nanismo desproporcional devido a um *splicing* deficiente, doença essa já descrita fenotipicamente por Back et al. (2008). Mutações no mesmo gene, em humanos, são descritas como causadoras da síndrome de Ehlers-Danlos, que apresenta sintomas como retardo de crescimento, osteopenia, deformidades faciais, articulações frouxas, displasias ósseas, aumento da elasticidade da pele e, na maioria dos casos, formas leves de retardo mental. Frouxidão das articulações foi observada nos cavalos com nanismo no estudo de Leegwater et al. (2016), porém as funções cognitivas não parecem estar afetadas nesses animais. A mutação no gene *B4GALT7* implica na desorganização das colunas de condrócitos na placa epifisária, o que leva aos sinais clínicos do nanismo (LEEGWATER et al., 2016).

O nanismo também já foi descrito em bovinos na raça Dexter, chamado de *bulldog dwarfism*, caracterizado por um nanismo desproporcional com retração facial e achados de condrodisplasia. Normalmente, animais homozigotos para a mutação no gene *ACAN* morrem durante a gestação, apresentando várias deformidades anatômicas, e heterozigotos nascem e apresentam membros encurtados (CAVANAGH et al., 2008). A raça de cão Basset Hound, além de outras, apresenta uma prevalência alta do nanismo, cuja causa, possivelmente, seja um problema primário de cartilagem na placa epifisária levando a um quadro de osteocondrodisplasia (MARTINEZ et al., 2007).

Camundongos *cmd* (cartilage matrix deficiency) apresentam um distúrbio autossômico recessivo causado por um defeito no gene codificador do proteoglicano agrecano. Os animais homozigotos apresentam fenda palatina e membros, cauda e focinho curtos, morrendo logo após o nascimento devido a insuficiência respiratória. Já os heterozigotos apresentam-se normais ao nascimento, porém desenvolvem o nanismo (observado pelo desalinhamento da coluna vertebral) a partir dos 19 meses de idade. Ao exame histopatológico, os animais heterozigotos apresentam degeneração dos condrócitos (com desorganização e vacuolização citoplasmática) somente em discos vertebrais, aparentando ser restrito a coluna espinhal. Os níveis de RNAm da molécula de agrecano foram mensurados e apresentaram diminuição em 81% e 41% dos animais heterozigotos e homozigotos, respectivamente, quando comparado a camundongos *wild-type* (WATANABE et al., 1997).

Em outro estudo com camundongos, a função do gene *GALNT3* foi testada a nível de condrócitos e animais que apresentavam mutação nos dois alelos do gene apresentaram retardo na ossificação endocondral com desorganização das placas epifisárias e encurtamento dos membros (no embrião), sugerindo que o *GALNT3* está envolvido na maturação dos condrócitos (YOSHIDA et al., 2014).

2.3 O nanismo na raça Mini-Horse

Na raça Mini-Horse, a enfermidade possui caráter autossômico recessivo e envolve o gene *Aggrecan* (*ACAN*) presente no cromossomo 1. Diversas mutações foram encontradas em diferentes *éxons* do gene descrito, sendo que cada mutação está associada a um fenótipo distinto de nanismo e são transmitidas de forma independente na população (EBERTH, 2013). As quatro mutações descritas no estudo de Eberth (2013) foram denominadas D1, D2, D3* e D4. A mutação D1 é causada por uma deleção no *éxon 2* do gene em questão, gerando um *stop códon* e, conseqüentemente, impedindo a produção da proteína funcional. A mutação D2 é causada por um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do tipo *missense* no *éxon 6*, levando a troca de uma valina por uma metionina. Da mesma maneira, a mutação D3* é causada por um SNP *missense* no *éxon 7* fazendo com que ocorra a troca de uma alanina por um aminoácido prolina. Anteriormente, esta mutação era denominada somente D3, pois Eberth (2013) a descrevia como uma deleção no *éxon 11*, o qual foi desconsiderada posteriormente pelo mesmo autor e reconhecida como a mesma mutação reportada por Metzger et al. (2017) em pôneis Shetland. Por fim, o genótipo D4 é causado por uma deleção de 21 pares de base no *éxon 15* do gene *ACAN*.

Animais que apresentam a mutação D1, em homozigose ou em heterozigose combinada com qualquer outra mutação (D2, D3* e D4), morrem durante a gestação. As demais mutações, em homozigose ou em heterozigose combinada, geram potros capazes de se desenvolver, porém com diferentes fenótipos anões.

2.4 A cartilagem

O tecido cartilaginoso é uma forma especializada de tecido conjuntivo, de origem mesenquimal, essencial para a formação e crescimento dos ossos longos

(na vida intrauterina e depois do nascimento) e possui uma maior rigidez quando comparado ao tecido conjuntivo de sustentação, devido às ligações eletrostáticas entre os glicosaminoglicanos. É composta por condrócitos e matriz extracelular, onde estão presentes proteoglicanos e colágeno que, juntamente a moléculas de água, conferem turgidez a matriz (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O tecido conjuntivo normalmente não possui vasos sanguíneos e, no caso das cartilagens articulares (que recobrem os ossos), são nutridas pelo líquido sinovial, sendo que os condrócitos, de maneira geral, vivem sob uma baixa tensão de oxigênio. Vasos sanguíneos, que por vezes aparecem na histologia, estão ali presentes pela nutrição de outros tecidos, não necessariamente da cartilagem. Também é possível observar a ausência de vasos linfáticos e nervos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A cartilagem articular é classificada como hialina, que é a mais comumente encontrada, e é composta, principalmente, por colágeno tipo II (secretado pelos condrócitos juntamente com proteoglicanos e glicoproteínas). A formação do primeiro esqueleto do embrião se dá a partir dela, que posteriormente é substituído por tecido ósseo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As articulações sinoviais, ou diartroses, são regiões que suportam atrito, deslizamento e pressão sem prejuízo, por isso possuem cartilagens articulares que recobrem as áreas de desgaste. Essa cartilagem é composta por condrócitos e matriz extracelular (MEC) por eles produzida. Os principais componentes da MEC são colágeno tipo II, ácido hialurônico, proteoglicanos e glicoproteínas. A maioria dos proteoglicanos é formada a partir de uma ligação não covalente de uma proteína central com outras moléculas, como o ácido hialurônico e a proteína de ligação (KIANI et al., 2002; EBERTH, 2013).

2.4.1 Placa epifisária

A placa epifisária, também chamada de disco epifisário ou placa de crescimento, é o local de crescimento longitudinal dos ossos longos localizada entre as epífises e diáfises que ocorre por meio da ossificação endocondral (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; MACKIE et al., 2008). Esse processo leva a substituição da cartilagem por tecido ósseo.

Inicialmente, os condrócitos se hipertrofiam, há redução e mineralização da matriz cartilaginosa e morte por apoptose dos condrócitos. Capilares sanguíneos e células osteogênicas invadem esse tecido em transição e depositam matriz óssea sobre a cartilagem calcificada. Posteriormente, a cartilagem é mantida na superfície do osso e no disco epifisário, também conhecido como cartilagem de conjugação, sendo que este último desaparecerá quando não houver mais crescimento longitudinal deste osso.

Basicamente, condrócitos mudam sua conformação conforme a localização na cartilagem: na periferia apresentam-se achatados e mais profundamente são arredondados e agrupados (grupos isógenos) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Desta maneira, há uma divisão em três camadas principais de condrócitos: as zonas de repouso, proliferativas e hipertróficas. A zona de repouso composta por cartilagem hialina, a zona proliferativa é responsável pela maior taxa de multiplicação celular e produção de matriz e a zona hipertrófica pela excreção de macromoléculas que modificarão a matriz extracelular, permitindo sua calcificação. Alterações na diferenciação e proliferação de condrócitos, bem como alterações nos componentes da matriz extracelular da placa epifisária, podem dar origem a diversas patologias relacionadas aos ossos, sendo a maioria delas as osteocondrodisplásicas (VAN DER EERDEN et al., 2003; BALLOCK e O'KEEFE, 2003; WEISBRODE, 2007). Como por exemplo, a osteoartrite que acomete todas as estruturas de uma articulação, iniciando-se por uma destruição da cartilagem articular com consequente lesão do osso subcondral. A perda da organização das zonas das matrizes (pericelular, territorial e interterritorial, em relação aos condrócitos) causada principalmente pela alteração na disposição da proteína da matriz oligomérica da cartilagem (ou trombospondina-5) é um achado na doença (HEINEGÅRD & SAXNE, 2011).

A arquitetura molecular da cartilagem é surpreendentemente complexa, com diferenças na concentração, dimensões e orientação das fibras de colágeno distribuídas pela MEC.

2.4.2 Agrecano

As moléculas de proteoglicanos que compõem a matriz são compostas por uma proteína central e inúmeras moléculas de glicosaminoglicanos ligadas a ela.

O agrecano é uma dessas moléculas de proteoglicano presente na cartilagem e em outros tecidos. Sua molécula é grande e tem função de agregação, essencial para manter a estrutura desse tecido. Mutações que levam a alteração dessa molécula são responsáveis por várias anormalidades no desenvolvimento ósseo, causando nanismo desproporcional (CAVANAGH et al., 2007).

Mutações no gene *ACAN* já foram descritas causando nanismo em várias espécies (LI et al., 1993; WATANABE et al., 1997; CAVANAGH et al., 2007; TOMPSON et al., 2009). Gleghorn et al. (2005) foram os primeiros a identificar uma mutação no gene *AGC1* (codificador da proteína central do agrecano) em humanos, propondo que esta glicoproteína se acumulava no retículo endoplasmático e não era excretado para o exterior da célula (matriz extracelular), causando uma displasia espôndiloepifisária que leva ao encurtamento de membros e tronco.

O agrecano é o proteoglicano mais abundante na MEC e tem a função de manter o tecido hidratado, por meio de um efeito osmótico que atrai e retém moléculas de água (KIANI et al., 2002; EBERTH, 2013).

A molécula do agrecano possui uma proteína central composta por três domínios designados G1, G2 e G3 e anexado a ela numerosas cadeias de sulfato de queratano (até 60 cadeias) e de sulfato de condroitina (aproximadamente 100 cadeias), que, juntas, representam 90% da massa molecular do agregano (KIANI et al., 2002; EBERTH, 2013). A sequência codificadora desses três domínios é muito conservada entre as espécies, diferente das sequências das cadeias colaterais. Em humanos, os *éxons* 2-19 codificam a proteína central do agrecano, os *éxons* 3-10 codificam os domínios G1 e G2, as cadeias de sulfato de queratano são codificadas pelo *éxon* 11 e parte do *éxon* 12, sendo que este último é responsável pela produção dos domínios CS1 e CS2 (DOEGE et al, 1997). *Splicing* alternativo ocorrendo nos *éxons* 13 a 18 de galinhas são responsáveis pela codificação do domínio G3 (DOMOWICZ et al., 2000).

2.5 Interleucinas e a articulação

Hormônios, citocinas, fatores de crescimento e até mesmo a força física que age sobre os ossos, além de outros fatores, são essenciais para o

desenvolvimento, crescimento e remodelamento ósseo (condrogênese). As citocinas, dentre elas as interleucinas, são produzidos local e sistemicamente e, usualmente, atuam em conjunto, reguladas de maneira altamente ordenada num organismo saudável ou comprometido. Supõe-se que um conjunto de citocinas específicas defina as respostas das células ósseas a um determinado estado e leve ao desenvolvimento ou não de injúrias naquele ambiente (SIMS e LORENZO, 2020).

IL-1, TNF- α , substância P, óxido nítrico e prostaglandinas encontram-se aumentadas nas doenças inflamatórias e degenerativas de articulações, sendo que as duas últimas inibem a síntese dos proteoglicanos pelos condrócitos, resultando em degeneração e perda do tecido cartilaginoso (WEISBRODE, 2007).

Além disso, dentre as metaloproteinases (MMP), existem as que são consideradas enzimas remodeladoras da MEC, juntamente com seus inibidores, que possuem papel fundamental no remodelamento e degradação da mesma (VAN DER EERDEN et al., 2003). As metaloproteinases de matriz são enzimas que constituem a matriz juntamente com os proteoglicanos, fibras de colágeno, entre outras moléculas, porém estão presentes na sua forma inativa. Além disso, podem ser ativadas pelos produtos derivados dos condrócitos reativos ou degenerados, da mesma maneira que pelas células inflamatórias presentes no tecido (WEISBRODE, 2007). IL-1, TNF- α e fragmentos de fibronectina regulam positivamente a ADAMTS (família de enzimas de protease extracelular de múltiplos domínios), mais especificamente a metaloproteinase ADAMTS-4, e em menor quantidade a ADAMTS-5, sendo que as duas levam a degradação do agregado em amostras de cartilagem (TORTORELLA et al., 1999; ARNER et al., 2002) (Figura 1).

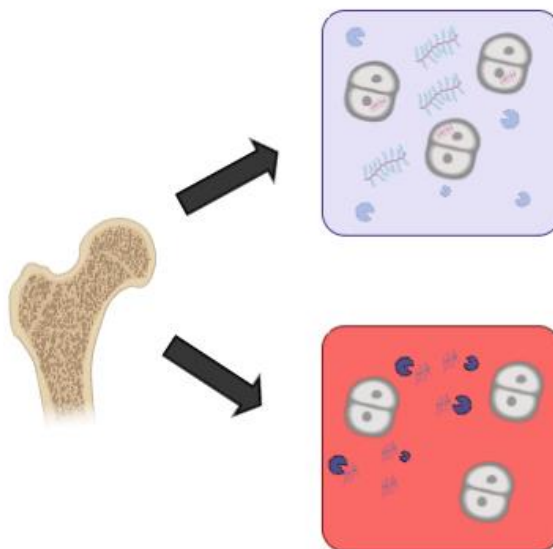


Figura 1. Esquema da cartilagem em condições fisiológicas (acima) e em condições inflamatórias (abaixo) com ação de citocinas e ativação das metaloproteinases. Criado com BioRender.

A interleucina-1 (IL-1), juntamente com o TNF, são secretados por macrófagos ativados, e ambos estimulam a reabsorção e inibem o crescimento ósseo. Porém, em camundongos, parece estar envolvida com o desenvolvimento normal da placa epifisária e remodelamento ósseo. As IL-1 alfa e beta provém de genes diferentes, entretanto possuem as mesmas funções, da mesma maneira que o TNF- α e β , os quais são potentes estimuladores da reabsorção óssea. Em doses mais baixas, atua como estimulante para a diferenciação de células precursoras mesenquimais em osteoblastos, enquanto que em concentrações mais altas inibe a função osteoblástica e formação óssea.

Mais recentemente, verificou-se, em humanos, que doenças tratadas com terapia anti-TNF aumentavam a densidade mineral óssea. A IL-6 atua da mesma forma que as citocinas anteriores, estimulando a reabsorção óssea, entretanto, existem evidências desta molécula poder estimular a formação óssea (SIMS e LORENZO, 2020).

Um estudo de Jikko et al. (1998) que utilizou culturas de condrócitos articulares de coelhos como modelo experimental, demonstrou que a IL-6 inibe a proliferação e síntese de proteoglicanos pelos condrócitos articulares, indo de encontro com outros autores que relataram a IL-6 como protetora contra a degradação da matriz da cartilagem articular induzida por IL-1, juntamente com a IL-4 (LOTZ e GUERNE, 1991; SHINGU et al., 1995). Lotz e Guerne (1991)

demonstraram que a IL-6 apresentou em sinoviócitos humanos um mecanismo de proteção que se equilibra com os efeitos catabólicos do TNF- α e IL-1 β .

A concentração de IL-6 no líquido sinovial de pacientes humanos com osteoartrite no joelho diminui conforme o grau da lesão aumenta (baseado em alterações radiográficas que estão diretamente relacionadas a função e dor), demonstrando que a IL-6 tem um papel na redução da destruição da cartilagem (ORITA et al., 2011). Orita et al. (2011) sugerem que o TNF- α esteja envolvido na patologia da osteoartrite em joelhos de pacientes humanos visto que houve detecção dessa citocina no líquido sinovial, concordando com outros autores que não puderam inferir o mesmo, provavelmente devido ao método de coleta e processamento utilizado.

CAPÍTULO II

Trabalho científico

Trabalho a ser enviado para a revista “*Animals*”, cujas normas podem ser encontradas em <https://www.mdpi.com/journal/animals/instructions#preparation>.

Aggrecan, IL-1 β , IL-6, and TNF- α profiles in articular cartilage of miniature horses with chondrodysplastic dwarfism

Roberta Martins Basso¹, Danilo Giorgi Abranches de Andrade¹, Carlos Eduardo Fonseca Alves¹, Renée Laufer-Amorim¹, Alexandre Secorun Borges¹, José Paes de Oliveira-Filho^{1,*}

¹São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, 18618-681, Brazil

* Correspondence: jose.oliveira-filho@unesp.br; Tel.: +55-14-3880-2083

Received: date; Accepted: date; Published: date

Simple Summary: Dwarfism, a skeletal disorder that causes proportionate or disproportionate abnormal growth, has been reported to occur in humans, dogs, cattle, mice, chickens and horses. In miniature horses, five independent mutations have been described to date (*D1*, *D2*, *D3**, *D4* and *c.6465A>T* variant) in the *aggrecan* gene. This proteoglycan is one of the most important molecules composing the extracellular matrix, with an essential role in maintenance of the cartilage structure and hydration of cartilage tissue through an osmotic effect that attracts and retains water molecules. Evaluation of the expression of aggrecan and specific important cytokines during the development of inflammation (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) in articular cartilage of miniature horses with chondrodysplastic dwarfism was the aim of this study. The results indicate that *ACAN* gene expression was higher in affected animals, and for the cytokines, no significant differences were detected between the groups. In conclusion, mutant aggrecan could potentially interfere with normal cellular function, leading to chondrodysplasia and the phenotypic findings observed.

Abstract: Dwarfism is a skeletal disorder causing abnormal growth. In miniature horses, it can occur as chondrodysplastic dwarfism, which is an autosomal recessive disorder associated with five mutations (*D1*, *D2*, *D3**, *D4* and *c.6465A>T* variant) in the *aggrecan* gene (*ACAN*). The aim of this study was to evaluate the expression of aggrecan (gene and protein) and specific cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) in the articular cartilage of miniature horses with chondrodysplastic dwarfism. Metatarsal bone samples from eight dwarf miniature horses were collected for histopathological analysis, and articular cartilage was collected for detection and quantification of aggrecan levels through Western blotting and the relative expression levels of *ACAN*, IL-1 β , IL-6, and TNF- α through qPCR. All affected animals presented chondrodysplasia-like lesions with disorganization of the chondrocyte layers and reduced amounts of extracellular matrix. No significant difference was found using the Western blotting technique with uncleaved samples to compare the expression of aggrecan in the dwarf group and control group (composed of phenotypically normal animals of similar age and breed two groups ($P = 0.7143$)). qPCR revealed that *ACAN* gene expression was higher in affected animals than in normal animals ($P = 0.0119$). Regarding cytokines, no significant differences were detected between the groups. Mutant aggrecan could potentially interfere with normal cellular function, leading to chondrodysplasia and the phenotypic findings observed.

Keywords: aggrecan, Western blotting, real-time polymerase chain reaction, chondrodysplasia, dwarfism, equine

1. Introduction

Dwarfism, a skeletal disorder that causes proportionate or disproportionate abnormal growth, has been reported to occur in humans [1], dogs [2], cattle [3], mice [4] and chickens [5]. Among horses, dwarfism has been described in Friesian horses [6,7], Shetland ponies [8,9] and miniature horses [10,11,12,13]. Mutations in the *aggrecan* (*ACAN*) gene [10,13] are associated with chondrodysplastic dwarfism, the phenotype of which includes impaired physical growth; a disproportionately large and malformed skull; a cleft palate or protruding tongue (in some cases); and shortened limbs, trunk and neck [9,10,12]. Due to the high risk of health complications and low animal welfare, many dwarf horses are euthanized [9,12].

The five mutations described in the *ACAN* gene are *D1* (g.95291270del), *D2* (g.95284530C>T), *D3** (g.95282140C>G), *D4* (g.95257480_95257500del) and the *c.6465A>T* variant [9,10,13]. Animals presenting mutations in homozygosis or in combined heterozygosis generate foals with dwarf phenotypes [9,10]. In addition, miniature breed horses with angular deformities and abnormal skeletal structure must be evaluated to rule out skeletal atavism, another heritable disorder characterized by abnormal growth of the ulna and fibula that extends the carpal and tarsal joints, respectively, already described in a miniature horse and in Shetland ponies [8,14].

Aggrecan, a proteoglycan produced by chondrocytes, is one of the most important molecules composing the extracellular matrix together with chondrocytes, type II collagen, hyaluronic acid and glycoproteins. It is a large molecule with an aggregation function that is essential for maintenance of the cartilage structure and hydration of cartilage tissue through an osmotic effect that attracts and retains water molecules. Mutations that lead to alterations in aggrecan are responsible for several abnormalities in bone development, causing disproportionate dwarfism [3,15].

Since previous studies on chondrodysplastic dwarfism in miniature horses have mainly investigated the genetic causes of the disease and its phenotypes [10,11,12,13], this study aimed to evaluate the profiles of aggrecan and specific important cytokines during the development of inflammation (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) in articular cartilage of miniature horses with chondrodysplastic dwarfism.

2. Materials and Methods

The study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals in Research (CEUA) of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo State University (UNESP) (no. 219/2016-CEUA). In addition, all owners allowed the use of their animals in this study through a consent statement authorizing sample collection.

Horses

Eight miniature horses (all alive) from two different farms in the state of São Paulo, Brazil, were admitted to the Large Animal Internal Medicine Section of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo State University (UNESP) with clinical signs compatible with chondrodysplastic dwarfism (short stature, disproportionate and short body, large head, pronounced frontal bone and eyes, shortened nasal bone, mandibular prognathism of varying degree and short and bowed limbs) (Figure 1).



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

In addition, three horses without clinical signs of this disease who died due to dystocia ($n = 2$) or euthanasia due to a congenital joint disorder in the left hind limb ($n = 1$) constituted the control group (CG). Peripheral blood (from live animals) or hair bulb tissue (from dead animals) was collected from all horses for *ACAN* genotyping tests. PCR and Sanger sequencing were performed for the *ACAN* gene mutations already described [10] according to previously described methods [11] (Table S1).

Body measurements (head length, head width, height at the withers, height at the croup, thoracic and abdominal circumferences, forelimb length (distance from the humeroradial joint to the metacarpophalangeal joint) and hindlimb length (distance from the femorotibial joint to the metatarsophalangeal joint) of these animals were obtained while alive and compared with those of animals of the same age with normal phenotypes. Radiographs were obtained for all dwarf animals to exclude skeletal atavism.

Sample collection

Animals that showed clinical signs of dwarfism were euthanized due to expected future complications. Complete necropsy was performed on all equines, with macroscopic evaluation of all thoracic and abdominal organs, the oronasal cavity, the skeleton, the joints and the nervous system. Samples of articular cartilage (from the proximal portion of the metacarpus) were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80°C until processing. In addition, the contralateral metatarsus was collected from each horse in 10% buffered formaldehyde and sectioned longitudinally to improve fixation. For animals that were already deceased when they were received, the collection was done in the same way but was completed as soon as possible to reduce any interference in the analyses.

Metatarsal bones were formalin-fixed for 48 hours, decalcified in nitric acid (HNO_3) and processed based on a conventional histological technique for embedding in paraffin. Subsequently, histological sections with a thickness of $4\text{ }\mu\text{m}$ were cut on a microtome (Leica, RM 2255, Germany) and stained with haematoxylin and eosin (H&E). Slides were evaluated and photographed under an optical microscope (ZEISS AX10, AxioCam ERc 5s). A modified Mankin's histological grading system [16] was used to evaluate chondrodysplasia of the articular cartilage. Two dwarf horses not belonging to the DG, namely, the 52-day filly and the 6-day filly, had their metatarsus collected for histopathological evaluation only.

Aggrecan isolation from cartilage

RIPA lysis buffer (1X, 500 μl , Millipore, Temecula, CA, USA) diluted in 1X phosphate-buffered saline (PBS) (with protease inhibitor) was added to each 100 mg of tissue in a tube with magnetic beads (Hard Tissue-Homogenizing CK28). The tissue was homogenized at 6500 rpm

(3x30x15s) with a Precellys® homogenizer (Bertin Instruments) for tissue fragmentation. The lysate was transferred to a 1.5 ml tube and subjected to centrifugation at 12,000 rpm for 12 min at 4 °C, and the supernatant was removed, lyophilized and diluted in 50 mM Tris-HCl. A NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (A280) was used for measurement, and the samples were subsequently stored at -80 °C.

To validate the methodology used to extract proteins from cartilage, a cartilage sample from a healthy adult horse (not miniature) was extracted, lyophilized and subjected to protein identification and quantification using shotgun proteomics by mass spectrometry, a large-scale proteomics technique.

Aggrecan Western blot analysis

Equal amounts of protein (20 µg) from each animal were denatured at 95 °C for 5 min in sample loading buffer (1:1 ratio) and subjected to SDS-PAGE in 10% polyacrylamide gels using a miniVE Vertical Electrophoresis System (GE Healthcare) at a voltage of 120 V and an amperage of 450 mA. The proteins were transferred to nitrocellulose (NC) membranes (Amersham™ Protran™ 0.2 µm NC, GE Healthcare, Germany).

To confirm the transfer of proteins, the membranes were stained with Ponceau S solution. The membranes were blocked in 5% non-fat milk (for the tubulin primary antibody) and bovine serum albumin (BSA) (for the aggrecan primary antibody) diluted in a mixture of PBS with 0.1% (v/v) Tween 20 (PBST) for two hours at room temperature. Then, the cells were incubated overnight at 4-8 °C with an ACAN polyclonal antibody (A8536, ABclonal) at a 1:100 dilution. α -Tubulin B-7 (sc-5286, Santa Cruz) at a 1:200 dilution was used as a loading control. Both antibodies were diluted in PBST buffer with 1% (w/v) BSA. The membranes were washed and incubated with a mouse IgG HRP antibody (GE Healthcare) for α -tubulin and a rabbit IgG HRP antibody (GE Healthcare) for ACAN. The bands were visualized using Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) with an ImageQuant™ LAS 500 camera (GE Healthcare Life Sciences). Densitometric quantification and determination of the relative abundance of proteins was performed with ImageJ software (version 1.53c; National Institutes of Health, Wisconsin, USA). The expression levels were normalized to those of α -tubulin, and the normalized results are expressed as the fold change as the mean $\pm$ SD.

The antibody used in this study targets amino acids 20-280 of the human aggrecan core protein (RefSeq NP_001126.3). Sequence alignment was carried out with the ClustalX 2.0 program with equine aggrecan core protein (RefSeq XP_005602856.2) (Figure S1).

Real-time quantitative PCR (qPCR)

Cartilage samples ($\approx$ 20 mg) were macerated with a Precellys® (Bertin Instruments) for total RNA extraction using an RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The relative purity and quality of the isolated RNA were assessed with a NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™), and the A260/280 ratio exceeded 1.8 for all samples. Briefly, total RNA was treated with DNase (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) to eliminate genomic DNA. First-strand cDNA synthesis was performed with approximately 500 ng of total RNA per 60 µl of reaction using an ImProm-II™ Reverse Transcription System following the manufacturer's instructions.

Relative quantification of mRNA was performed using a standard curve-based method for relative real-time qPCR data processing [17] with a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Specific primers [18] were utilized to detect the mRNA expression of the equine (*Equus caballus*) interleukins *IL-1 β* (ECU_92481), *IL-6* (ECU_64794) and *TNF- α* (AB_035735); these primers amplified fragments of 81 bp. The primer used to quantify equine ACAN mRNA expression (GenBank ID: 100033876) amplifies a 110 bp region [19]. *Equus caballus* β -actin

(AF_035774.1) was used as a reference gene [20]. The primer sets used in this study are described in Table S2.

For qPCR, each sample was tested in triplicate in a total volume of 20 μ l, which contained 0.2 μ M of each forward and reverse primer, 2 μ l of template cDNA, 10 μ l of qPCR Master Mix (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega®), and 7.2 μ l of nuclease-free water. In addition, a no-template control was included on each plate to confirm that amplicon contamination was absent. The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 10 min and 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s followed by melting curve analysis. Amplification of specific transcripts was confirmed by the melting curve profiles generated at the end of each run.

The expression of all cytokine genes was normalized to *Equus caballus* β -actin mRNA expression. Standard curves were made for the *IL-1*, *IL-6* and β -actin genes using tenfold serial dilutions of liver cDNA (collected from a dwarf). For the *TNF- α* gene, a standard curve was made using fivefold serial dilutions of cDNA from monocyte cultures activated with lipopolysaccharide (LPS). For the *ACAN* gene, a standard curve was made using fivefold serial dilutions of cDNA from a pool of cartilage samples (collected from dwarf animals). The mean Δ Ct for all animals was calculated (for the CG and dwarf group (DG)) to evaluate the relative expression separately for each gene.

The relative expression was quantified with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (27) using DataAssist™ v3.01 software (Thermo Fisher Scientific).

Statistics

The data were analysed with GraphPad Prism® software (version 5.01). Mann-Whitney *U* tests were used for analysis of unmatched pairs. A $P < 0.05$ was accepted as an indicator of statistical significance.

3. Results

Of the eight animals with a dwarf phenotype, six had the D4/c.6465A>T variant genotype and were one day old; thus, these animals were used for the DG. Two other animals with dwarf phenotypes were 6 and 52 days old, so they were not added to the DG. Of the three animals that were part of the CG, two had the N/N genotype (including the equine that presented congenital joint disorder in the left hind limb), and one was heterozygous for *ACAN*:c.6465A>T.

Skeletal atavism was excluded in all of the animals by radiographic examination since the horses did not have complete fibulas or ulnas. The body measurements of the 1-day-old horses belonging to the two groups are shown in Table S3.

3.1 Necropsy and histopathologic examination

No gross alterations were observed in the internal organs during necropsy; however, the long bones of the limbs of the DG horses were shortened (Figure 2).

Histopathological examination was performed on all animals in each group. All dwarf horses (DG) had severe chondrodysplasia in articular cartilage (Figure 3). The two dwarf horses not belonging to the DG, namely, the 52-day-old filly and the 6-day-old filly, also presented moderate and severe chondrodysplasia (i.e., disorganization of the chondrocyte layers, with a lack of differentiated chondrocytes and with decreased amounts of cartilaginous matrix), respectively. No changes were observed in the same tissues of the animals in the CG.



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

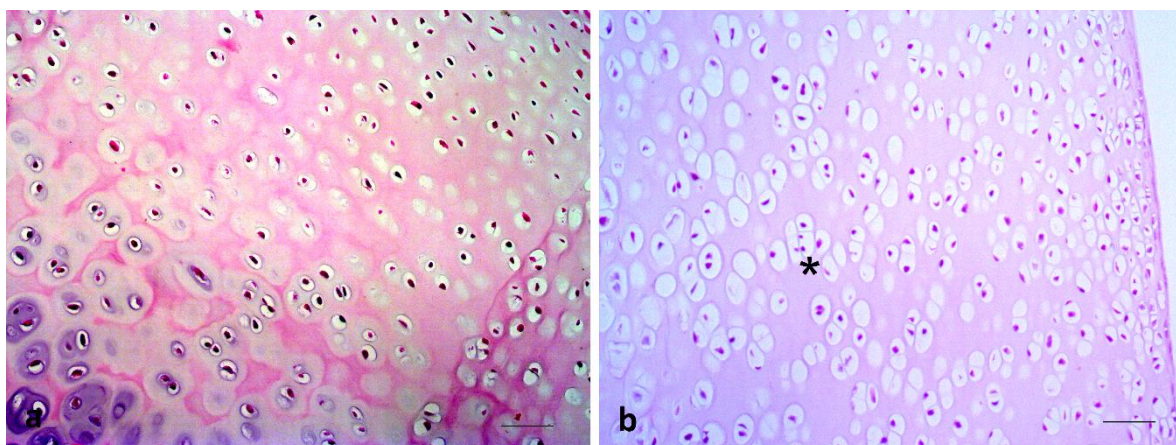


Figure 3. Histological images of the articular cartilage (a, b) from miniature horses. H&E. (a) One-day-old miniature horse without dwarfism (CG) with normal articular cartilage. Bar = 50 μ m. (b) One-day-old miniature horse with dwarfism (DG) with articular cartilage showing severe lesions; note the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

3.2 Analysis of aggrecan in control and dwarf equines by Western blot analysis

Approximately 70 proteins were detected by mass spectrometry, including aggrecan and other proteins present in cartilage tissue (vimentin, chondroadherin, fibromodulin, decorin, biglycan, hyaluronan and proteoglycan link protein 1, α and β -tubulin, fibronectin) (Table S4).

Western blot analysis demonstrated that there was no significant difference between groups in the expression of aggrecan in the DG compared with the CG ($P = 0.7143$) (Figure 4).

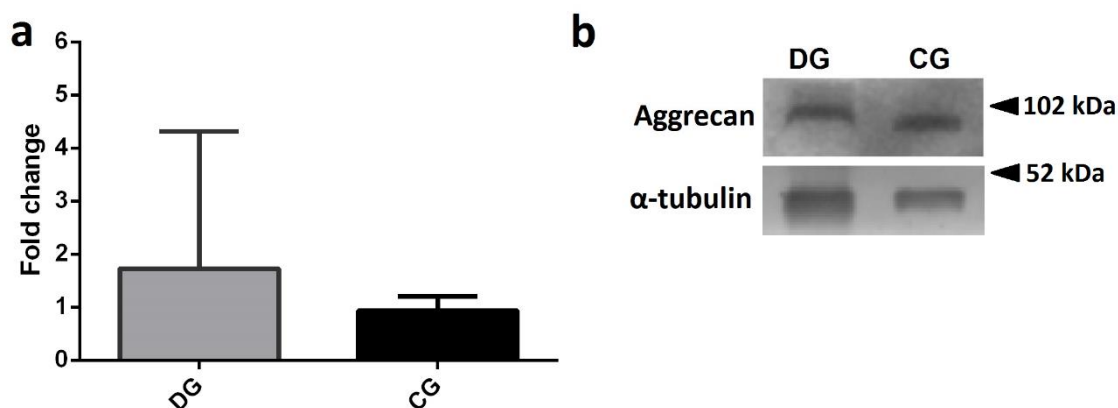


Figure 4. (a) Mean ($\pm$ SD) chemiluminescence intensity for aggrecan (bands at 100 kDa). (b) Representative Western blots of aggrecan (20 μ g of protein/lane) and α -tubulin, which was used as a loading control for sample normalization.

Upon observing the fold change in each sample separately, we found that one horse in the DG had higher expression of aggrecan than the other horses in the same group (Figure 5).

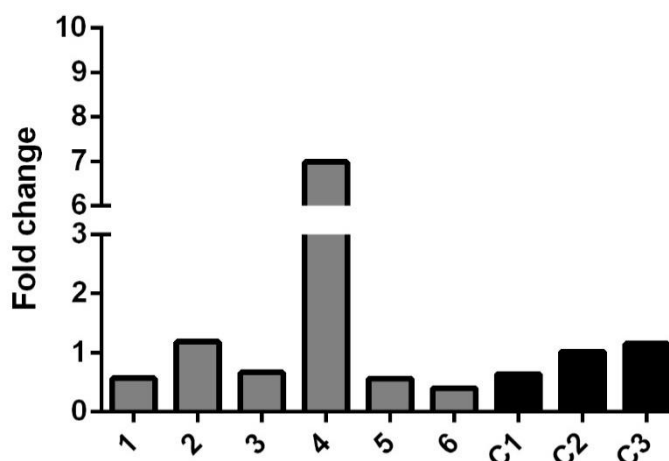


Figure 5. Aggrecan levels relative to α -tubulin levels as quantified by densitometric analysis of the bands. The grey bars represent the animals in the DG, and the black bars represent the animals in the CG.

3.3 Expression analysis of cytokines and aggrecan by qPCR

This analysis was performed for the eight animals with a dwarf phenotype, i.e., the six one-day-old neonates in the DG and the two dwarf animals not included in this group, and the CG animals. Relative quantification of four genes (*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , and *aggrecan*) was performed using a standard curve-based method for relative real-time qPCR data processing [17].

qPCR analysis showed that the expression of equine aggrecan in the cartilage of dwarf animals was very high; the cycle threshold (CT) values were similar to those obtained for the housekeeping gene β -actin. A significant difference was observed between the two groups ($P = 0.0119$) (Figure 6).

There was no significant difference in cytokine expression between the two groups. However, among dwarf equines, two animals (2 and 6) from the DG had higher relative cytokine

mRNA expression than the other animals in the same group. The relative expression levels of each studied gene are shown in Table 1.

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

	Dwarf							Control				P value
	1	2	3	4	5	6	Median	1	2	3	Median	
IL-1 β	1.0	588.0	0.6	0.8	2.5	181.0	1.75	0.9	0.5	2.3	0.9	0.3333
IL-6	6.1	2521.4	1.4	4.9	10.6	1176.3	8.35	0.7	0.5	2.8	0.7	0.0476
TNF- α	0.7	9.6	0.8	0.8	0.6	2.1	0.8	1.2	0.8	1.0	1.0	0.7143
ACAN	19.2	11.8	8.4	14.6	11.8	4.2	11.8	1.6	0.6	1.1	1.1	0.0119

Relative quantification was performed using a standard curve-based method for processing relative real-time qPCR data [17]. The mean values of the groups were compared by Mann-Whitney U tests. A P value < 0.05 indicates a statistically significant difference.

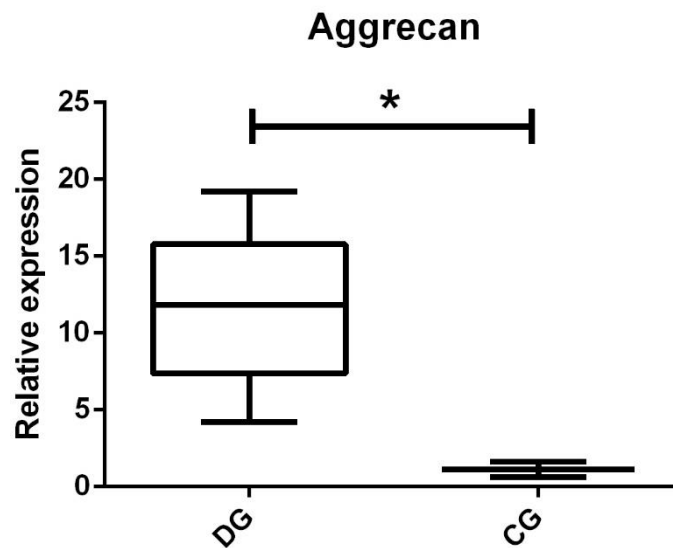


Figure 6. Box plots showing the relative expression of aggrecan in articular cartilage. The top bar is the maximum observed expression level, the bottom bar is the minimum observed expression level, the top of the box is the upper or third quartile, the bottom of the box is the lower or first quartile,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

The PCR products for the *ACAN* gene from the two affected and three control animals were sequenced, confirming the specificity and sensitivity of the primers. No CT value was recorded for the blank control sample.

4. Discussion

The clinical signs observed in the miniature horses with dwarfism in this study were similar to those previously reported [9,10,11,12]. Chondrodysplasia was observed in all dwarf miniature horses that underwent histological evaluation. Osteochondrodysplasia has been found in the epiphyseal plates of costochondral junctions in dwarf Friesian horses, suggesting a local defect or a change in the system that regulates the growth plate [6]; this condition has more recently been found to be correlated with a mutation in the *B4GALT7* gene, which is highly expressed on the growth plate and is responsible for proteoglycan integrity [7]. In a previous study, no

evidence of chondrodysplasia (chondrocyte disorganization, deformation or reduction in chondrocyte size) was found on histopathological examination of a dwarf miniature Shetland pony with the *D3*/D3** genotype, and no evidence of premature ossification was observed. In that case, chondrodysplasia was suggested as an underlying cause of the disproportionate phenotype. In addition, researchers have proposed that disturbances in the adhesion and interaction of chondrocytes in the early stages of ossification result in the dwarfism phenotype [9].

In this study, the protocol used for Western blotting, which has never been used previously, was able to detect aggrecan in equine cartilage, although the antibody manufacturer described reactivity only with human and mouse material. The aggrecan sequence was BLASTed using the ClustalX program to compare the amino acid sequence recognized by the ACAN polyclonal antibody (A8536, ABclonal) with the *Equus caballus* aggrecan core protein sequence (RefSeq XP_005602856.2), revealing 94% identity (Figure S1). The ACAN antibody was tested with undigested and digested extract material from articular cartilage with chondroitinase ABC from *Proteus vulgaris* (Sigma-Aldrich) and collagenase type IV (Sigma) separately, and the 100 kDa band was observed in the three samples when they were compared (results not shown).

Although there was no significant difference between the two groups in the expression of proteoglycans, a trend towards higher values in the DG was observed. Aggrecan, the major proteoglycan in articular cartilage, is expressed by chondrocytes, exhibits load-bearing properties and plays fundamental roles during chondroskeletal morphogenesis [15]. However, considering that there was no significant difference in aggrecan expression between the two groups (the DG and CG), this molecule, which is considered essential, seems to maintain its expression levels even in miniature horses that present the *D4/c.6465A>T* variant genotype for chondrodysplastic dwarfism. One dwarf horse (animal 4) showed higher expression than other horses in the same group; however, there was no correlation of *Aggrecan* mRNA expression, cytokines and clinical or histopathological findings. Among the limitations of this study, we can mention the reduced number of control animals used, since animals that had already died naturally or animals euthanized only due to poor prognosis were used.

In one study, aggrecan and tenascin levels as measured through mass spectrometry were found to be increased in humans with early shoulder osteoarthritis and slightly decreased in humans with advanced shoulder osteoarthritis. However, in general, the results of the study demonstrated downregulation of the expression of extracellular matrix proteins in both the early and advanced groups [21].

In another study, a mutation in the G3 domain of aggrecan that causes spondyloepimetaphyseal dysplasia (SEMD)-type aggrecan production in humans was found not to affect the trafficking or secretion of this proteoglycan; however, surface plasmon resonance revealed influences on the binding and kinetics of this domain with tenascin-C [1] that probably disrupt the functional stability of the matrix. The authors suggested that variations in the amount and/or structure of the aggrecan can produce height variations.

Aggrecan mRNA levels have been measured in mice with cartilage matrix deficiency (CMD) and found to be 81% and 41% lower in heterozygous and homozygous animals, respectively, than in wild-type animals [4]. In addition, in a study on tamoxifen-treated transgenic mice with knockin of a 3.8 kb transgene in the 3'UTR of the endogenous *ACAN* gene, the concentrations of aggrecan protein and mRNA isolated from the bone and cartilage of homozygotes were found to be 50% lower than those in wild-type littermates. Heterozygous mice exhibited 18-20% lower mRNA levels than wild-type mice but showed aggrecan protein expression similar to that in wild-type mice, demonstrating that the biallelic presence of the Cre transgene in homozygous mice impaired the expression of *ACAN* mRNA and caused dwarfism. It is unclear why *ACAN* expression was reduced in homozygous mice because no part of the endogenous *aggrecan* gene was excised or replaced [22].

Real-time qPCR in this study was performed with primers that have been previously described [18, 19, 20], and the relative expression was calculated using the standard curve method to avoid problems currently associated with PCR efficiency assessment [17]. qPCR analysis showed that the expression of aggrecan in cartilage (in both groups) was very high, with CT values similar to those obtained for β -actin, indicating that this proteoglycan was expressed similarly to the housekeeping gene in equine cartilage. Our data showed that the CT values for *aggrecan* in the CG were 20.5 ± 0.34 , whereas Pawlak et al. (2012) obtained threshold values of 29.02 ± 1.37 for *aggrecan* in samples from digital laminae of the hooves of healthy horses. These findings confirm that the proteoglycan aggrecan is essential for the development and maintenance of cartilage, even when its molecular structure is affected.

In general, we observed higher expression of the analysed genes in the DG than in the CG. *Aggrecan* was approximately 11 times more abundant in the dwarf animals than in the control animals, and the difference was significant (P value = 0.0119). Nevertheless, the protein expression of *aggrecan* remained constant (as observed by Western blotting), with no significant difference between groups. In general, mutations that lead to structural changes in a protein tend to cause partial or complete cell retention and/or degradation of the mutant protein [23], as in lethal bulldog syndrome in miniature zebu, in which there is truncation of the chondroitin sulfate domain as well as loss of the ACAN C-terminal globular domain [24].

The median relative expression levels of *IL-1 β* , *IL-6* and *ACAN* were higher in the DG than in the CG, and only *TNF- α* expression was lower. Excluding animals 2 and 6 from the analysis of cytokines, which had discrepant values, the relative expression levels of *IL-1 β* became lower in the DG than in the CG.

The two animals with discrepant cytokine expression (animals 2 and 6) values did not show any alterations on necropsy that would indicate an inflammatory process, except for chondrodysplasia, which was also observed in other animals in the same group. However, it is not possible to rule out any concomitant illness with different phases of the inflammatory process, although they are not visible in macroscopic examination and histopathology.

Although there were no statistically significant differences in cytokine levels between the two groups, these protein changes could potentially interfere with normal cellular function (as chondrodysplasia was observed on histopathological examination) and culminate in a local inflammatory process.

Our data on the relative expression of *IL-6* are consistent with the findings of Jikko et al. (1998) [25] and Orita et al. (2011) [26], who indicated that the proinflammatory cytokine IL-6 is markedly upregulated during tissue inflammation, induces proteoglycan degradation and inhibits chondrocyte proliferation. The levels of IL-6, similar to those of IL-8 and IL-18, have been found to be increased in synovial fluid in the contexts of early and late osteoarthritis [21]. IL-6 and IL-8 may play regulatory roles during the inflammatory process in osteoarthritis [27].

IL-1 β is a key cytokine that induces catabolic events in cartilage at the early and late stages of arthritis, while TNF- α is involved primarily in the onset of arthritis [27]. The relative expression of aggrecan has been found to be downregulated by between 2- and 3-fold in osteoarthritic chondrocytes cultured with alginate after stimulation with the interleukin IL-1 β , indicating the occurrence of anabolic events [27]. Thus, IL-1 β alone does not result in the expression of collagen-degrading matrix metalloproteinases (MMPs) [28]. Proteoglycan and collagen degradation are regulated by IL-1 β , inducing the synthesis of active enzymes that degrade proteoglycans, such as aggrecanase [27].

The CT values obtained for cytokines in dwarf liver samples in the current study were very high (indicating low expression) compared to those in the pooled cartilage samples, making it impossible to create a dilution curve to determine the thresholds for the cytokines. This probably occurred because the cytokines in the foals were released by circulating cells of the immune system (mainly macrophages and T and B cells) and primarily by cells in tissues where endochondral ossification was occurring (such as fibroblasts of the bones and cartilage).

5. Conclusions

In summary, we analysed aggrecan using Western blotting and real-time qPCR and assessed *IL-1 β* , *IL-6* and *TNF- α* expression by real-time qPCR. To our knowledge, this report is the first to describe the evaluation of aggrecan in dwarf horses. A mutant protein was expressed in the dwarf animals, and it is unlikely that this protein was capable of fulfilling its physiological function, probably contributing to chondrodysplasia and the phenotypic findings observed. The inflammatory process in cartilage was shown to vary among the animals evaluated, perhaps because of dysplasia resulting from the mutation in the *ACAN* gene or another unidentified inflammatory process. The findings of this study contribute to the understanding of the etiopathogenesis of chondrodysplastic dwarfism in miniature horses.

Author Contributions: J.P.O.F. and A.S.B. conceived the experiment. R.M.B. and D.G.A.A. conducted the physical examinations, sampling collection and molecular analysis. R.L.A. and R.M.B. conducted the histological examinations. R.M. B, C.E.F.A. and R.L.A. conducted the Western blot analysis. R.M.B. and J.P.O.F. conducted the qPCR analysis. R.M.B., D.G.A.A., A.S.B. and J.P.O.F. analysed the results. All authors reviewed the manuscript.

Funding: This research was funded by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), with financial support (2016/24767-7) and scholarship to R.M.B. (2018/11365-3) and to D.G.A.A. (2016/24025-0).

Acknowledgements: We thank the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) for financial support (2016/24767-7) and scholarship to D.G.A.A. (2016/24025-0) and to R.M.B. (2018/11365-3), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the research scholarship to J.P.O.F. (307686/2018-3). We thank the LNBio - Brazilian Biosciences National Laboratory, CNPEM/MCTIC, for shotgun analysis. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors would also like to thank all the breeders who collaborated and agreed to the use of samples of their horses in the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Supplementary Materials: Supplementary material for this article is available online.

ACAN Antibody	** * 20	* 40	60	* 80	*
Homo sapiens	VETSDHDNSLSVSIQPSPLRVLLGTSLTIPCYFIDMHPVTTAPSTAPLAPRIKWSRVSKKEVLLVATEGRVRVNSAYQDKVSLPNYPAI				
Equus caballus	VDVSDPDNSLSVSIPEPSPLRVLLGTSLTIPCYFIHPTHPVTTAPSTAPLAPRIKWSRISKEKEVLLVATEGQVRVNSAYQDRVSLPNYPAI				
ACAN Antibody	* 100	* 120	140	160	180
Homo sapiens	PSDATLEVQSLRSNDGVIYRCEVMHGIEDSEATLEVVKGVIFHYRAISTRYTLDFDRAQRAQLQNSAIITPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLA				
Equus caballus	PTDTLELQNLRSNDGVIYRCEVMHGIEDSEATLEVVKGVIFHYRAISTRYTLDFDRAQRAQLQNSAIITPEQLQAAYEDGFHQCDAGWLA				
ACAN Antibody	* 200	220	240	260	Identity (%)
Homo sapiens	DQTVRYPIHTPREGCGYGDKDEFPGVRTYGIKDTNETYDVYCFEEMEGEVYFATSPEKFTFQEAANECRRLGARL				100
Equus caballus	DQTVRYPIHLPREGCGYGDKDEFPGVRTYGIKDTNETYDVYCFEEMEGEVYFATSPEKFTFQEAANECRRLGARL				94

Figure S1. 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.

Table S1. Primer sequences used for *D1*, *D2*, *D3**, *D4* and *c.6465A>T ACAN* variants

Primer	Sequence (5'-3')	Coding exon
JP_ACAN_D1	F: ACCCTGACAACTCGCTGA	2
	R: TCACCTCGCAGCGATAGAT	
JP_ACAN_D2	F: AGATGCCACTGCCACAAA	6
	R: GTGGTCACCTGTACCACAAG	
JP_ACAN_D3*	F: GGAAAGAGGGAATGAACAGAGG	7
	R: AGTGACTGAATTAACCCACAGG	
JP_ACAN_D4	F: CGGTGAGGCCAGTTCTTT	14
	R: TCAGCTCCAATCTGCTTGTC	
DG_ACAN_Eq_F13	F: CAGTGGGACAACATCTGGAA	11
	R: CTTCTCCACTGGACTCAACAA	

Table S2. Equine primer sets used for real-time quantitative PCR.

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	GenBank Gene ID	Tm (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
IL_1B_eq_RT_PCR	F: ATGACTTACTGCAGCGGCAAT R: GTCTTGGAAGCTGCCCTTCA	ECU92481	80	81	Figueiredo et al., 2009
IL_6_eq_RT_PCR	F: TGCTGGCTAAGCTGCATTCA R: GGAAATCCTCAAGGCTTCGAA	ECU64794	79	81	Figueiredo et al., 2009
TNF_alfa_eq_RT_PCR	F: AAAGGACATCATGAGCACTGAAAG R: GGGCCCCCTGCCTTCT	AB035735	83	81	Figueiredo et al., 2009
Bactin_eq_RT_PCR	F: CATTGTCCACCTTCCAGCAGATGT R: CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGAT	100033878	83*	86	Oliveira Filho et al., 2010
ACAN_eq_RT_PCR	F: CAACAACAATGCCCAAGACTAC R: AGTTCTCAAATTGCAAGGAGTG	100033876	83*	110	Pawlak et al., 2012

Tm: predicted melting temperature

*Tm not cited in the original article; value found in this study

Table S3. Mean of body measurements obtained from miniature dwarf horses 1 day old with disproportionate dwarfism and horses without dwarfism (controls) 1 day old

Body measurement	Dwarfs (n=6)	Controls (n=3)
Weight (kg)	9.1	8.8
Wither height (cm)	41.7	51.3
Croup height (cm)	38.0	52.7
Head width (cm)	1.8	13.0
Head length (cm)	16.3	21.0
Thoracic circumference (cm)	45.7	45.3
Abdominal circumference (cm)	41.7	42.0
Forelimb length (cm)	21.8	27.0
Hindlimb length (cm)	25.0	34.3

Table S4. Proteins detected in healthy adult equine (not miniature) articular cartilage by the shotgun technique.

	emPAI	Protein
1	72 (65)	Serum albumin
2	34 (32)	Globin A1
3	42 (41)	Proline and arginine rich end leucine rich repeat protein
4	42 (37)	Enolase 1
5	30 (27)	Milk fat globule-EGF factor 8 protein OS=Equus caballus
6	25 (23)	Pyruvate kinase
7	27 (25)	Vimentin
8	21 (21)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
9	14 (14)	Gelsolin
10	29 (20)	Chondroadherin
11	17 (17)	Fibromodulin
12	12 (12)	Annexin
13	12 (11)	Phosphoglycerate kinase 1
14	12 (12)	Lysozyme
15	12 (12)	Uncharacterized protein
16	3 (2)	Thrombospondin 4
17	8 (8)	Aggrecan
18	17 (10)	Uncharacterized protein
19	9 (8)	L-lactate dehydrogenase
20	9 (8)	Decorin
21	8 (8)	Actin gamma 1
22	14 (9)	Serotransferrin
23	15 (14)	Haemoglobin subunit alpha
24	8 (8)	Biglycan
25	5 (4)	Annexin A1
26	4 (4)	Phosphatidylethanolamine binding protein 1
27	8 (6)	Triosephosphate isomerase

28	7 (7)	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1
29	11 (8)	Apolipoprotein A1
30	5 (5)	Serpin family F member 1
31	4 (4)	Uncharacterized protein
32	6 (5)	Uncharacterized protein
33	5 (4)	Glucose-6-phosphate isomerase
34	3 (3)	Clusterin
35	3 (3)	Betaine-homocysteine S-methyltransferase
36	4 (3)	Collagen type VI alpha 3 chain
37	4 (4)	Annexin
38	2 (2)	Purine nucleoside phosphorylase
39	3 (3)	Heat shock protein family B (small) member 1
40	4 (4)	Selenium binding protein 1
41	3 (3)	Uncharacterized protein
42	2 (2)	Glutathione S-transferase
43	4 (4)	Alcohol dehydrogenase (NADP+)-like protein
44	2 (2)	Protein S100
45	7 (3)	Elongation factor 1-alpha
46	2 (1)	Annexin
47	2 (2)	Superoxide dismutase
48	5 (4)	Uncharacterized protein
49	5 (2)	Tubulin beta chain
50	3 (3)	Phosphoglucomutase 1
51	5 (3)	Uncharacterized protein
52	1 (1)	Alpha-1B-glycoprotein
53	1 (1)	Uncharacterized protein
54	3 (3)	Macrophage migration inhibitory factor
55	1 (1)	Uncharacterized protein
56	2 (2)	Heat shock protein family A (Hsp70) member 1 like
57	2 (2)	Fructose-bisphosphate aldolase
58	2 (1)	Peroxiredoxin 5
59	4 (2)	Plastin 3
60	4 (3)	Uncharacterized protein
61	1 (1)	ATP synthase subunit beta
62	2 (1)	Fibronectin
63	1 (1)	Histone H2A
64	2 (2)	Dihydropyrimidinase like 2
65	3 (2)	Peroxiredoxin 6
66	1 (1)	Annexin
67	2 (1)	Collagen type VI alpha 1 chain
68	1 (1)	Osteoglycin
69	2 (1)	Cilia and flagella associated protein 44
70	2 (1)	Tubulin alpha chain
71	2 (2)	Uncharacterized protein
72	5 (1)	Eukaryotic translation elongation factor 2
73	4 (1)	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha

emPAI: exponentially modified protein abundance index

References

1. 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* **2009**, *v. 84*, p. 72–79.
2. 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* **2007**, *v. 71*, p. 66–69.
3. 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. *Mamm Genome* **2007**, *v. 18*, p. 808–814.
4. 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* **1997**, *v. 94*, p. 6943–6947.
5. 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* **1993**, *v. 268*, n. 31, p. 23504–23511.
6. 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* **2008**, *v. 40*, n. 3, p. 282–287.
7. 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* **2016**, *v. 17*, n. 839.
8. Rafati, N.; Andersson, L.S.; Mikko, S.; Feng, C.; Raudsepp, T.; Pettersson, J.; Janecka, J.; Wattle, O.; Ameer, 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* **2016**, *v. 6*, n.7, p.2213–2223.
9. 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* **2017**, *v. 28*, n. 3–4, p. 43–151.
10. Eberth, J.E.; Graves, K.T.; Macleod, J.N.; Bailey, E. Multiple alleles of ACAN associated with chondrodysplastic dwarfism in Miniature horses. *Animal Genetics* **2018**, *v. 49*, p. 413–420.
11. 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* **2020**, *v. 32*, p. 99–102.
12. 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* **2014**, *v. 30*, n.1, p.001–004.
13. 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* **2020**, *v. 10*, n. 15238.
14. Tyson, R.; Graham, J.P.; Colahan, P.T.; Berry, C.R. Skeletal Atavism In A Miniature Horse. *Veterinary Radiology and Ultrasound* **2004**, *v. 45*, n. 4, p. 315–317.
15. Kiani, C.; Chen, L.; Wu, Y.J.; Yee, A.J.; Yang, B.B. Structure and function of aggreCAN. *Cell Research* **2002**, *v. 12*, n. 1, p. 19–32.

16. Mankin, H.J.; Johnson, M.E.; Lippiello, L. Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteoarthritic Human Hips. *The Journal of Bone and Joint: Surgery* **1981**, *v. 63-A*, n. 1, p. 131-139.
17. Larionov, A.; Krause, A.; Miller, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **2005**, *v. 6*, n. 62.
18. 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* **2009**, n. 131, p. 65–72.
19. 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* **2012**, *v. 73*, n. 7.
20. Oliveira Filho, J.P.; Badial, P.R.; Cunha, P.H.J.; Cruz, T.F.; Araújo 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* **2010**, *v. 135*, p. 34-42.
21. 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* **2013**, *v. 15*, R180.
22. Rashid, H.; Chen, R.; Hassan, Q.; Javed, A. Dwarfism in homozygous *Agc1CreERT* mice is associated with decreased expression of aggrecan. *Genesis* **2017**, *v. 55*, e23070.
23. 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* **2009**, *v. 10*, p. 173–183.
24. 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* **2018**, *v. 19*, n. 91.
25. 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* **1998**, *v. 22*, n. 9/10, p. 615–621.
26. 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* **2011**, *v. 12*, p. 144.
27. Stöve, J.; Huch, K.; Günther, K-P.; Scharf, H-P. Interleukin-1 β Induces Different Gene Expression of Stromelysin, Aggrecan and Tumor-Necrosis-Factor-Stimulated Gene 6 in Human Osteoarthritic Chondrocytes in vitro. *Pathobiology* **2000**, *v. 68*, p. 144–149.
28. Beekman, B.; Verzijl, N.; de Roos, J.A.D.M.; TeKoppele, J.M. Matrix degradation by chondrocytes cultured in alginate: IL-1 β induces proteoglycan degradation and proMMP synthesis but does not result in collagen degradation. *Osteoarthritis and Cartilage* **1998**, *v. 6*, p. 330–340.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Discussão geral

Em relação aos achados compatíveis com condrodisplasia no exame microscópico da cartilagem articular dos equinos anões foi um achado já descrito para a raça (Andrade et al., 2020b), sendo que em um dos trabalhos dois equinos Mini-Horse anões com genótipo D4/D4 (Andrade et al., 2020a) apresentavam lesão discreta e o outro lesão acentuada. Back et al. (2008) observou alterações semelhantes as deste estudo, nas placas epifisárias das junções costochondrais de equinos Friesian anões, caracterizando uma osteocondrodisplasia. Pelo desenvolvimento anormal destes equinos, os autores sugerem um defeito local ou uma alteração no sistema que regula a placa de crescimento, provavelmente ligado a um defeito genético que não foi elucidado no estudo. No entanto, foi elucidado por Leegwater et al. (2016) posteriormente como uma mutação no gene *B4GALT7*, altamente expresso na placa de crescimento e responsável pela integridade proteoglicanos, causando as alterações observadas na placa de crescimento dos equinos Friesian do estudo de Back et al. (2008).

Entretanto, em pôneis miniatura da raça Shetland apresentando nanismo causado por mutação no gene *ACAN* (D3*), não foram encontradas evidências de condrodisplasia (desorganização, deformação ou redução do tamanho dos condrócitos) no exame histopatológico, bem como não houve evidência de ossificação prematura. Porém, apesar dos achados, os autores sugerem um quadro de condrodisplasia como causa subjacente causando o fenótipo desproporcional. Além disso, propõem um distúrbio na adesão das células e interação deficiente destas em estágios iniciais de ossificação resultando no fenótipo do nanismo (METZGER et al., 2017).

Até o momento existem cinco mutações descritas na literatura (D1, D2, D3*, D4 e o variante c.6465A>T) e a maioria dos equinos (7/8) deste estudo eram heterozigotos para D4/c.6465A>T no gene *ACAN*, e um animal apresentava a mutação D4 somente em um alelo, o que segundo a literatura não é possível levar ao fenótipo anão (EBERTH, 2003). Porém os achados fenotípicos de todos os equinos Mini-Horse anões deste estudo foram compatíveis com os descritos na literatura (EBERTH, 2003), mas nos leva a considerar outra mutação presente no rebanho brasileiro envolvida com a enfermidade em questão.

O anticorpo utilizado na técnica de *Western blot* a fim de detectar o agrecano foi eficaz permitindo a validação do mesmo para o proteoglicano em equinos através de uma análise *in silico* utilizando da ferramenta BLAST, comparando a sequência de aminoácidos reconhecido pelo anticorpo com a sequência da proteína central do agrecano equino (RefSeq XM_005602799.2), obtendo uma identidade de 96% e posteriormente identificação das proteínas extraídas a partir da cartilagem articular pela espectrometria de massa (*shotgun*).

Embora não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos na expressão do proteoglicano agrecano, foi observada uma tendência a valores mais elevados no GA. O agrecano, principal proteoglicano na cartilagem articular, é expresso pelos condrócitos e exibe propriedades de suporte de carga e desempenha papéis fundamentais durante a condrogênese (KIANI et al., 2002). No entanto, considerando que não houve diferença significativa na expressão de agrecano entre equinos Mini-Horse anões de um dia de vida e equinos da mesma idade sem o fenótipo anão (GC), essa molécula considerada essencial parece manter seus níveis de expressão mesmo em cavalos que apresentam a variante D4/c.6465A>T para nanismo condrodisplásico.

A análise de qPCR mostrou que a expressão do ACAN na cartilagem (em ambos os grupos) foi muito elevada, com valores de CT semelhantes aos obtidos para β -actina, indicando que este proteoglicano é expresso de forma semelhante ao *housekeeping* na cartilagem equina. Nossos dados mostraram que os valores de CT para o ACAN no GC foram $20,5 \pm 0,34$, enquanto Pawlak et al. (2012) obtiveram valores de $29,02 \pm 1,37$ para o mesmo gene em amostras de lâminas de cascos de cavalos saudáveis.

De maneira geral, observamos maior expressão dos genes analisados no GA do que no GC. O ACAN teve sua expressão aproximadamente 11 vezes maior nos equinos anões do que no GC, com diferença significativa (valor $p = 0,0119$). No entanto, a expressão do proteoglicano permaneceu constante (conforme observado por *Western blotting*), sem diferença significativa entre os grupos. Em geral, as mutações que levam a mudanças estruturais em uma proteína tendem a causar retenção celular parcial ou completa e/ou degradação da proteína mutante (RASHID et al., 2017), como na síndrome do buldogue letal em zebus miniatura, em que há truncamento do domínio sulfato de condroitina, bem como perda do domínio globular do agrecano (STRUCK et al., 2018).

A expressão de proteínas da matriz extracelular em humanos com osteoartrite diferiu quando comparados os estágios da doença, sendo que os níveis de agrecano e tenascina medidos por espectrometria de massa apresentavam-se aumentados no início da afecção e ligeiramente diminuídos no estágio avançado (WANNER et al., 2013).

Em outro estudo, uma mutação no domínio G3 do agrecano que causa a displasia espôndiloepifisária em humanos, não afetou o tráfico ou a secreção deste proteoglicano. No entanto, a ressonância de plasmon de superfície revelou alterações na ligação e na cinética deste domínio com tenascina-C (TOMPSON et al., 2009) que provavelmente levam a desestabilidade funcional da MEC.

Os níveis de mRNA de agrecano foram mensurados em camundongos *cmd* (*cartilage matrix deficiency*), os quais apresentavam 81% e 41% a menos em animais heterozigotos e homozigotos, respectivamente, do que em animais *wild type* (WATANABE et al., 1997).

A mutação c.6465A>T (presente em sete dos oito equinos anões do trabalho) ocorre no éxon codificante 11, que é responsável pela tradução do domínio sulfato de condroitina, e sendo este domínio carregado negativamente atua na captação das moléculas de água e manutenção da homeostase da MEC. E codificado pelo éxon 14, onde encontra-se a mutação D4 (encontrada em todos os animais anões deste estudo), o domínio G3, baseado em modelos animais, pode regular a ligação das cadeias dos glicosaminoglicanos e tem papel importante na liberação do agrecano (KIANI et al., 2002). No entanto, podemos considerar que a molécula do agrecano nos animais anões apresenta alterações estruturais e provavelmente funcionais que culminam nos achados histopatológicos e consequentemente fenotípicos.

No entanto, a frequência das mutações (já descritas na literatura para os equinos Mini-Horse) no Brasil para D1, D2, D3* são 0,003, 0,017 e 0,016, respectivamente, já a mutação D4 e variante c.6465A>T possui frequência alélica de 0,244 e 0,112, respectivamente. É necessário levar em consideração o fato de que neste trabalho todos os animais anões que fizeram parte do GA possuíam as mutações mais frequentes no nosso país (D4 e variante c.6465A>T). Portanto, é possível que a expressão do agrecano possa variar em cavalos Mini-Horse anões com as mutações D1, D2 e D3*, principalmente devido

a diferente localização das mutações e consequentemente sítio do proteoglicano.

As medianas dos níveis de expressão relativa de *IL-1 β* , *IL-6* e *ACAN* foram maiores no GA do que no GC, e apenas a expressão de *TNF- α* foi menor. Excluindo os animais 2 e 6 da análise de citocinas, que apresentavam valores discrepantes, os níveis de expressão relativa de *IL-1 β* tornam-se menores no GA do que no GC.

Os dois animais com valores discrepantes de expressão de citocinas (animal 2 e 6) não apresentaram alterações na necropsia que indicassem processo inflamatório, exceto pela condrodisplasia que também foi observada em outros animais do mesmo grupo. No entanto, não é possível descartar qualquer doença concomitante com possível processo inflamatório, embora não tenha sido visto ao exame macroscópico e histopatológico.

Nossos dados sobre a expressão relativa de *IL-6* são consistentes com os achados de Jikko et al. (1998) e Orita et al. (2011), que indicou a *IL-6* como citocina pró-inflamatória, liberada durante a inflamação do tecido, induzindo a degradação de proteoglicanos e inibindo a proliferação de condrócitos. Os níveis de *IL-6*, semelhantes aos de *IL-8* e *IL-18*, estão aumentados no líquido sinovial em contextos de osteoartrite inicial e tardia (WANNER et al., 2013). *IL-6* e *IL-8* podem desempenhar papéis regulatórios durante o processo inflamatório na osteoartrite (STÖVE et al., 2000).

IL-1 β é uma citocina chave que induz eventos catabólicos na cartilagem nos estágios iniciais e avançados da artrite, enquanto o *TNF- α* está envolvido principalmente no início desta enfermidade (STÖVE et al., 2000). Verificou-se que a expressão relativa de agrecano é diminuída em 2 a 3 vezes em condrócitos osteoartíticos cultivados com alginato após estimulação com a interleucina *IL-1 β* , indicando a ocorrência de eventos anabólicos (STÖVE et al., 2007). A degradação do proteoglicano e do colágeno é regulada pela *IL-1 β* , induzindo a síntese de enzimas ativas que degradam os proteoglicanos, como a agrecanase (STÖVE et al., 2000). Porém, a *IL-1 β* sozinha não resulta na ativação das metaloproteinases da matriz degradante do colágeno (BEEKMAN et al., 1998).

Embora não tenha sido observado diferença estatística significativa nos níveis de expressão das citocinas entre os dois grupos, as mutações presentes no gene *ACAN* dos equinos anões estudados podem interferir potencialmente

na função celular normal do proteoglicano (como a condrodisplasia observada no exame histopatológico) e culminar em um processo inflamatório local.

Conclusões gerais

Em resumo, foi quantificado o proteoglicano agrecano utilizando a técnica de *Western blotting* e qPCR e avaliamos a expressão gênica das citocinas *IL-1 β* , *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-1 β 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-1/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 Joint: 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.; HELDIGE, 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-1 β 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.

ANEXOS

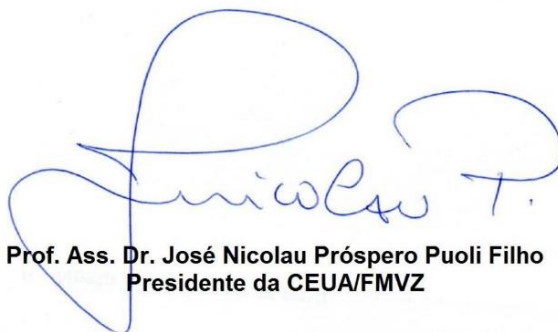
Atestado - Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



A T E S T A D O

Atesto que o subprojeto intitulado “Estudo da proteína agrecano e do padrão de citocinas associado ao nanismo em equinos da raça Mini-Horse no Brasil” faz parte do Projeto “Estudo clínico e molecular do nanismo do tipo condrodisplásico em equinos da raça Mini-Horse no Brasil”, **Protocolo CEUA 0219/2016**, aprovado em 09 de fevereiro de 2017, a ser conduzido por **Roberta Martins Basso**, orientada pelo Prof. Dr. José Paes de Oliveira Filho, para fins de pesquisa científica, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Botucatu, 14 de novembro de 2019.



Prof. Ass. Dr. José Nicolau Próspero Puoli Filho
Presidente da CEUA/FMVZ



UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof.Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n
UNESP - Câmpus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880.2175 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br

