

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

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DE ENFERMIDADES GENÉTICAS
MUSCULARES EM EQUINOS QUARTO DE MILHA DE
VAQUEJADA**

LÍDIA MARIA SANTOS SPERANDIO

**BOTUCATU – SÃO PAULO
FEVEREIRO DE 2024**

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

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DE ENFERMIDADES GENÉTICAS
MUSCULARES EM EQUINOS QUARTO DE MILHA DE
VAQUEJADA**

LÍDIA MARIA SANTOS SPERANDIO

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

Orientador: Prof.º Ass. Dr. José Paes
de Oliveira-Filho

**BOTUCATU – SÃO PAULO
FEVEREIRO DE 2024**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Sperandio, Lídia Maria Santos.

Frequência alélica de enfermidades genéticas musculares em equinos quarto de milha de vaquejada / Lídia Maria Santos Sperandio. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Oliveira-Filho

Capes: 50501062

1. Paralisia Periódica Hiperpotassêmica. 2. Hipertermia Maligna. 3. Músculos - Doenças. 4. Equinos - Doenças hereditárias.

Palavras-chave: HyPP; MH; MYHM; Miopatia; PSSM1.

Nome do Autor: Lídia Maria Santos Sperandio

Título: FREQUÊNCIA ALÉLICA DE ENFERMIDADES GENÉTICAS MUSCULARES EM EQUINOS QUARTO DE MILHA DE VAQUEJADA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.º Dr. José Paes de Oliveira-Filho

Presidente e Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo

Prof.º Dr. Alexandre Secorun Borges

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo

Profa.º Dra. Cíntia Ferreira

Membro

Grupo Ser Educacional – Uninassau, Natal, Rio Grande do Norte

Data da defesa: 02 de fevereiro de 2024

AGRADECIMENTOS

A Deus e minha intercessora Virgem Maria, que me concederam saúde e disposição para que eu pudesse realizar os meus objetivos.

Aos meus pais, Angela e Nivaldo, por toda educação, amor e carinho comigo. Obrigada por sempre estarem me apoiando e me orientando em todas as minhas tarefas e sonhos.

A minha irmã, Liz, por estar presente em toda a minha trajetória.

Aos meus avós, paternos e maternos, que sempre me motivaram com todo carinho que puderam me dar.

Ao meu orientador, Prof.^o José Paes de Oliveira-Filho, por ter me aceito como orientada e com isso pude realizar um sonho em fazer parte da pós-graduação da UNESP/Botucatu. Obrigada por toda oportunidade, ensinamentos e por contribuir no meu crescimento pessoal e profissional.

Aos docentes da Clínica de Grandes Animais, Prof.^o Alexandre Secorun Borges, Prof.^o Rogério Martins Amorim e Prof.^o Wanderson Adriano Biscola Pereira, pelo apoio, paciência, confiança e ensinamentos.

Ao meu amigo Lukas Garrido, todos os ensinamentos, orientações, dicas. Por ter feito meus dias no laboratório mais alegres.

Aos meus amigos de pós-graduação, Raíssa Leite, Fabrício Cerri, Roberta Basso e Ana Maria, por toda ajuda, pela parceria, risadas, aprendizados.

A Thaísa por sempre me apoiar e acreditar em mim.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, por ter me concedido a bolsa (2021/13539-1).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

LISTA DE ABREVIACÕES

AIES = anti-inflamatórios esteroides

AQHA = American Quarter Horse Association AQHA

AST = aspartato transaminase

ATP = adenosina trifosfato

Ca²⁺ = cálcio

CE = carboidratos estruturais

CK = creatina quinase

CNE = carboidratos não estruturais

GBED = Deficiência de Enzima de Ramificação do Glicogênio

HERDA = Astenia Cutânea Hereditária Equina

HYPP = Paralisia Periódica Hipercalêmica

IMM = Miosite Inflamatória imunomediada

KG = Quilograma

MC = Miotonia Congênita

MH = Hipertermia Maligna

MHC = Myosin heavy chain

MyHC = miosina de cadeia pesada

MYHM = Miopatia de cadeia pesada de miosina

PAS = ácido periódico-Schiff

PCR = reação em cadeia de polimerase

PSSM = Miopatia por Acúmulo de Polissacarídeo

QM = Quarto de Milha

qPCR = reação em cadeia de polimerase em tempo real

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	3
1. Introdução	4
2. Revisão de literatura	5
2.1 Miopatia de cadeia pesada de miosina (<i>MYHM</i>)	5
2.1.1 Etiologia	6
2.1.2 Epidemiologia.....	7
2.1.3 Patogênese	7
2.1.4 Manifestações clínicas e Patologia clínica	8
2.1.5 Diagnóstico	9
2.1.6 Diagnósticos Diferenciais	9
2.1.7 Tratamento e Prognóstico	10
2.2 Miopatia por Acúmulo de Polissacarídeo (<i>PSSM</i>)	10
2.2.1 Etiologia	10
2.2.2 Epidemiologia.....	11
2.2.3 Patogênese	12
2.2.4 Manifestações clínicas e Patologia clínica	12
2.2.5 Diagnóstico	13
2.2.6 Diagnóstico diferencial	13
2.2.7 Tratamento e prognóstico	14
2.2.8 Manejo da dieta e programa de exercícios	14
2.3 Paralisia Periódica Hipercalêmica (<i>HYPP</i>)	15
2.3.1 Etiologia e Epidemiologia	16
2.3.2 Patogênese	16
2.3.3 Sinais Clínicos e Patologia Clínica.....	17
2.3.4 Diagnóstico e Diagnóstico Diferencial.....	17
2.3.5 Tratamento e Prognóstico	18
2.3.6 Dieta.....	18
2.4 Hipertermia Maligna (<i>MH</i>).....	19
2.4.1 Etiologia e Epidemiologia	19
2.4.2 Patogênese	20
2.4.3 Sinais Clínicos e Patologia Clínica.....	20
2.4.4 Diagnóstico	21
2.4.5 Diagnóstico Diferencial.....	21
2.4.6 Tratamento e Prognóstico	21

2.5	Considerações gerais.....	22
3.	Objetivo	22
4.	Referências	23
CAPÍTULO II		30
Artigo Científico.....		31
CAPÍTULO III		43
Considerações Finais		44
Normas para submissão		45

SPERANDIO, L. M. S. **ENFERMIDADES GENÉTICAS MUSCULARES EM EQUINOS QUARTO DE MILHA DE VAQUEJADA**. Botucatu, 2024. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Quarto de Milha (QM) é uma das principais raças de atletas do Brasil, participando de 22 modalidades. A vaquejada está entre as modalidades que mais cresceram nos últimos anos. O QM pode ter seu desempenho afetado por distúrbios genéticos musculares, dentre elas podemos destacar paralisia periódica hipercalêmica (*HYPP*), hipertermia maligna (*MH*), miopatia por acúmulo de polissacarídeo tipo 1 (*PSSM1*), e miopatia da cadeia pesada de miosina (*MYHM*). Considerando que a frequência alélica (*FA*) dessas variantes é desconhecida no QM de vaquejada, este estudo teve como objetivo avaliar as *FAs* em cavalos registrados na ABQM com histórico de competidor de vaquejada. Amostras de pelo foram coletadas aleatoriamente de 129 QM de propriedades localizadas na região Nordeste do Brasil e posterior realizada a purificação de DNA e sequenciamento de Sanger para todas as quatro variantes. Dentre as variantes que foram encontradas no QM de vaquejada, somente foram detectadas em heterozigose. A variante do gene *MYH1* foi a que mais prevaleceu 8% (10/122), seguido por *GYS1* em três (2%) dos 129 animais, e por fim, a *SCN4A*, com 0,8% (1/126) animais. A variante *RYS1* (*MH*) não foi detectada nos animais testados. O coeficiente de endogamia (*F*) foi avaliado em 81 QM (81/129), 55 eram endogâmicos e o *F* médio entre eles foi de 0,029 (2,9%). Conclui-se que as variantes *MYHM*, *PSSM1* e *HyPP* estão presentes no QM brasileiro de vaquejada, sendo importante seu diagnóstico prévio, visto sua transmissão hereditária, afim de evitar a reprodução desses animais.

Palavras chave: *MYHM*, *PSSM1*, *HyPP*, *MH*, Miopatia

SPERANDIO, L. M. S. **ALLELE FREQUENCY OF MUSCULAR GENETIC DISORDERS IN BULL-CATCHING (VAQUEJADA) QUARTER HORSES.** Botucatu, 2024. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Quarter horses (QH), one of the main athlete breeds in Brazil, participating in 22 disciplines. *Vaquejada* (bull-catching) is among the disciplines that has grown the most in recent years. The QH can have their performance affected by muscular genetic disorders, such as hyperkalemic periodic paralysis (HYPP), malignant hyperthermia (MH), polysaccharide storage myopathy type 1 (PSSM1), and myosin-heavy chain myopathy (MYHM). *Vaquejada* is a significant Brazilian equine discipline that primarily involves QH. Considering that these variants allele frequency (AF) is unknown in *vaquejada* QH, this study aimed to evaluate the AFs in registered ABQM horses with *vaquejada* history. Hair samples were collected randomly from 129 QH from properties located in Northeast region of Brazil and DNA purification and Sanger sequencing for all four variants were performed. From the 81 animals assessed (81/129 animals), 55 were inbred and the average inbreeding coefficient (F) among them was 0.029 (2.9%). The average F estimated for this population was 0.003 or 0.3% (minimum: different from zero; maximum: 0.51). These variants were exclusively observed in heterozygosity. The MYHM variant exhibited the highest prevalence at 8% (AF = 0.04 ± 0.01), followed by PSSM1 (2%, AF = 0.01 ± 0.01), and the HYPP variant (0.8%, AF = 0.004 ± 0.01). In conclusion, the variants MYHM, PSSM1, and HyPP are present in Brazilian *vaquejada* QH, and their previous diagnosis is important, since their hereditary transmission, to avoid indiscriminate reproduction of the animals.

Keywords: MYHM, PSSM1, HyPP, MH, myopathy

CAPÍTULO I

1. Introdução

A equideocultura no Brasil é bastante marcante no ponto de vista econômico e social. Segundo a Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) em 2020 realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o rebanho equino do Brasil cresceu 2% comparado com os dados dos anos anteriores, estimando cerca de 5,7 milhões de cabeças. Os equinos estão ativamente envolvidos no transporte, nas atividades agrícolas, na saúde humana (equoterapia), nos exércitos e cada vez mais vem ganhando espaço nos esportes (MAPA, 2016).

O cavalo da raça Quarto de Milha (QM) é um dos principais destaques no cenário esportivo equestre brasileiro. A principal característica da raça é a versatilidade, devido a sua velocidade e docilidade em realizar movimentos rápidos e precisos como giros em torno do seu eixo, paradas bruscas e mudanças de direção com extrema agilidade, participando de 22 modalidades esportivas diferentes, como por exemplo, apartação, corrida, rédeas, tambor, conformação e vaquejada (COELHO et al., 2014; ABQM, 2022).

A Vaquejada é um esporte equestre genuinamente nordestino, de origem centenária, em decorrência da criação de bovinos no sertão (BRITO FILHO, 2014). A Vaquejada é uma modalidade considerada Patrimônio Cultural Imaterial do Brasil (Lei 13.364/2016), visto que, está entre as que mais cresceram nos últimos anos, movimentando mais de R\$ 800 milhões de reais por ano e gerando cerca de 720 mil empregos, de maneira direta e indireta, para famílias nordestinas (ABQM, 2022).

Dita a relevância dessas questões, sabe-se que distúrbios musculares são um fator significativo no comprometimento da saúde e desempenho atlético desses animais. A manutenção da saúde muscular é essencial para o sucesso da locomoção e bem-estar geral, uma vez que o músculo esquelético compreende cerca de 55% do peso corporal do cavalo. A seleção genética para características desejáveis, como o aumento de massa muscular, força, velocidade e resistência, pode ter causado o aumento, de forma inadequada, a frequência de disfunções hereditárias (ALEMAN et al., 2022).

Desde os anos 90 até os dias atuais, anormalidades genéticas foram identificadas no cavalo QM (ALEMAN, 2008), dentre elas, mutações responsáveis pela paralisia periódica hipercalêmica (*HYPP*) (RUDOLPH et al.,

1992), deficiência de enzima de ramificação do glicogênio (*GBED*) (WARD et al., 2004), hipertermia maligna (*MH*) (ALEMAN et al., 2004), astenia dérmica regional hereditária equina (*HERDA*) (TRYON et al., 2007), miopatia por acúmulo de polissacarídeo tipo 1 (*PSSM1*) (MCCUE et al., 2008) e miosite inflamatória imunomediada (*IMM*) (FINNO et al., 2018; GIANINO et al., 2019; VALBERG et al., 2018).

Desde 2015, todos os garanhões registrados na *American Quarter Horse Association* (AQHA), devem ser obrigatoriamente testados, antes do registro dos seus filhos, para o painel de doenças genéticas (*HYPP*, *GBED*, *HERDA*, *PSSM* e *MH*) e a partir de 2023 a enfermidade MYMH também foi introduzida no painel (SIX-PANEL). A partir de 2020, a Associação Brasileira de Criadores de Quarto de Milha (ABQM), também tornou obrigatória a apresentação dos exames dessas cinco doenças genéticas (FIVE-PANEL), para todos os garanhões com coberturas a partir de 1º de julho de 2020, sendo seus filhos dependentes da apresentação do mesmo para finalização do registro (ABQM, 2020).

Considerando as interferências que as doenças genéticas musculares podem causar no desempenho atlético e na qualidade de vida de equinos QM, é apresentado nesse capítulo uma revisão bibliográfica sobre a *MYHM*, *PSSM1*, *HYPP* e *MH*.

2. Revisão de literatura

2.1 Miopatia de cadeia pesada de miosina (*MYHM*)

Miopatia de cadeia pesada de miosina (*MYHM*) é a nomenclatura utilizada para descrever duas manifestações clínicas musculares denominadas miosite imunomediada (*IMM*) e rabdomiólise não-exercional, sendo que ambas são causadas pela mesma mutação. A *IMM* é conhecida por causar atrofia muscular aguda em raças relacionadas ao Quarto de Milha, e tem como fatores desencadeantes, estímulos ambientais como vacinações prévias e patógenos que acometem o sistema respiratório, entretanto, não são bem esclarecidas. Na rabdomiólise não associada ao exercício, o animal desenvolve também atrofia muscular, porém, bem menos evidente e de evolução lenta (FINNO et al., 2018; VALBERG et al., 2018; ALBUQUERQUE et al., 2021).

Outra enfermidade, que vem sendo relatada, que pode ocorrer em cavalos em associação com sinais clínicos de *IMM* é a rara síndrome fatal calcinose sistêmica. No entanto, até o momento, ainda não está claro por qual razão cavalos que apresentam essa variante podem desenvolver a calcinose sistêmica (SPONSELLER et al., 2022).

2.1.1 Etiologia

As fibras musculares são classificadas em tipo I e tipo II, sendo que as fibras de contração lenta (tipo I) são mais finas, possuem um rico suprimento sanguíneo e mitocondrial e têm uma grande quantidade de mioglobina, sendo adaptadas para contração contínua dos músculos. Já as fibras de contração rápida (tipo II) são fibras mais grossas, com período curto de duração, com menos suprimento sanguíneo e de metabolismo aeróbico, sendo bem adaptadas para salto, corrida e outros movimentos breves e potentes (KLEIN, 2014).

Nos equinos as fibras musculares do tipo II são constituídas por isoformas específicas da proteína de Cadeia Pesada de Miosina (MHC - Myosin heavy chain), denominadas de fibras puras dos tipos 1, IIA e IIX, sendo responsáveis pelas variações na atividade da ATPase e da velocidade de contração entre elas. Fibras híbridas possuem duas ou mais isoformas da MHC em sua composição, contendo MHC lenta e rápida (RIVERO et al., 2016).

A *MYHM* é uma doença autossômica codominante, com penetrância variável, associada à variante *E321G* no gene *MYH1* o qual codifica a produção da proteína muscular específica MHC2X, encontrada em fibras musculares de contração rápida do tipo IIX. A etiologia de algumas doenças imunomediadas não são totalmente conhecidas, porém estímulo ambiental associado a predisposição genética é a causa mais provável para a *IMM* (FINNO et al., 2018), no entanto, em 40% dos casos não é possível identificar esse estímulo (ROTHWELL et al., 2013).

Infecções pela bactéria *Streptococcus equi* estão frequentemente associadas à ocorrência de rabdomiólise sem esforço (SPONSELLER et. al, 2005) e miosite imunomediada em equinos. A proteína M liberada da superfície bacteriana, principalmente do gênero *Streptococcus* spp., possui uma sequência de aminoácidos que se assemelham consideravelmente à proteína MHC2X que é codificada pelo gene *MYH1*, por essa razão, sugere-se que infecções prévias

por essas bactérias são consideradas um gatilho para o desenvolvimento de IMM, devido a resposta imune adaptativa ser acionada por epítomos compartilhados entre elas (FINNO et al., 2018; PAHLMAN et al., 2006). Outros fatores como a presença de infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Anaplasma phagocytophilum*, herpes vírus equino, o vírus da influenza equina e alguns adjuvantes vacinais também são considerados gatilhos para IMM (HUNYADI et al., 2017).

2.1.2 Epidemiologia

A IMM ocorre em cavalos da raça Paint Horses, Appaloosas e predominantemente em linhagens de cavalos da raça Quarto de Milha. Esses animais que fazem parte da população de risco estão relacionados a fatores ambientais que desencadeiam a doença, associados às linhagens, pedigree e frequência alélica (GIANINO et al., 2019; VALBERG et al., 2020).

Nos EUA a maior prevalência da variante *MYH1* foi encontrada em maior proporção em garanhões da linhagem de rédeas (24%), *working cow* (17%) e conformação (16%) (VALBERG et al., 2020). Estudos demonstram que em cerca de 47% dos equinos Quarto de Milha com a variante patológica do gene *MYH1* apresentaram histórico de infecção por *Streptococcus spp.* ou vacinação contra influenza, herpes vírus tipo I e *Streptococcus equi* subesp. *equi*, doença respiratória ou gastrointestinal, nos três meses antecedentes ao desenvolvimento de atrofia muscular (VALBERG et al., 2022).

No Brasil a frequência de cavalos homozigotos e heterozigotos para a variante responsável pela *MYHM*, também apresentou predomínio pela linhagem de rédeas (21,9%, 34/155), entretanto, a mutação em heterozigose também foi encontrada em cavalos das linhagens de tambor e baliza (10%, 4/40), apartação (6%, 2/33), corrida (5,7%, 2/35) e conformação (5,5%, 2/36) (ALBUQUERQUE et al., 2021).

2.1.3 Patogênese

A miosina de cadeia pesada (MyHC) é uma proteína estrutural citoplasmática motora do músculo e forma estrutura de filamentos sarcômeros. Se houver mutação nessa proteína, a depender de qual isoforma, seu tipo e

localização, pode apresentar diferentes expressões fenotípicas (VALBERG et al., 2018).

A variante *E321G* do gene *MYH1* do cromossomo 11, altera a composição de aminoácidos da região da cabeça globular, impactando potencialmente a estabilidade da proteína, afetando a atividade da ATPase das fibras musculares tipo IIX. Essa variante, substitui um ácido glutâmico negativamente carregado, por uma glicina não polar, havendo a perda de ligações de hidrogênio, reduzindo o contato entre as áreas de domínio da cabeça globular da fibra 2X (FINNO et al., 2018; VALBERG et al., 2020).

Em equinos portadores da variante, a exposição de nova isoforma de miosina ao ambiente extracelular, causa infiltração linfocítica e destruição de miofibras, predominantemente do tipo IIX (GIANINO et al., 2019). Já a falta de infiltrados linfocitários vistas em amostras musculares de cavalos com MYHM sugere que a reação imune, mediada por células, no músculo esquelético, não foi capturada ou um mecanismo imune mediado não é totalmente responsável no caso da rabdomiólise não induzida por exercício (VALBERG et al., 2020).

A designação comum para os genótipos é: heterozigoto afetado (My/N); homozigoto afetado (My/My); e wild-type não afetado (N/N). Os homozigotos My/My geralmente apresentam sinais clínicos mais graves e apresentação recorrente em comparação com os heterozigotos (VALBERG et al., 2020).

2.1.4 Manifestações clínicas e Patologia clínica

Sinais clínicos de IMM são caracterizados por rápida atrofia, simétrica, particularmente de musculatura epaxial e gluteal e aumento do tônus muscular. Em 48 horas pode ocorrer cerca de 40% da perda de massa muscular e persistir por meses (LEWIS et al., 2007). É possível ser observado na rabdomiólise não induzida por exercício, episódios de rigidez, dor acentuada, fraqueza e decúbito (VALBERG et al., 2020). No caso de associação com a calcinose sistêmica, um indicador precoce é a presença de edema ventral. Sinais adicionais incluem mal-estar, febre baixa, rigidez, atrofia muscular e falência de diversos órgãos (VALBERG et al., 2020; SPONSELLER et al., 2022).

As anormalidades hematológicas associadas à *MYHM*, como neutrofilia e hiperfibrinogenemia, são resultado de um processo infeccioso concomitante. É comum as atividades séricas de creatina quinase (CK) e aspartato transaminase

(AST) estarem muitas vezes superiores a 100.000 U/L (VALBERG et al., 2020), (Referência para espécie de 145 a 380 U/L e 220 a 600 U/L, respectivamente) (CONSTABLE et al., 2017).

2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de *MYHM* em equinos é realizado a partir das manifestações clínicas, seguido de teste genético e, se necessário, biópsia muscular para histopatologia (VALBERG et al., 2018).

No histopatológico e imuno-histoquímica, de biópsias das musculaturas acometidas, geralmente é observado infiltrado inflamatório nos miócitos e em torno de vasos sanguíneos, composto principalmente por linfócitos CD4+, CD8+, CD20+ e macrófagos, além da redução do tamanho das células devido a atrofia muscular (LEWIS et al., 2007). Esta técnica é eficiente para a complementação do diagnóstico da doença desde que realizada durante os estágios iniciais dos sinais clínicos, visto que em estágios mais avançados dificultam achados específicos. Em amostras musculares de cavalos com calcinose sistêmica, a histopatologia pode revelar células gigantes multinucleadas e calcificação distrófica de fibras musculares (SPONSELLER et al., 2022).

O padrão ouro para o diagnóstico é o teste genético, onde é possível distinguir os animais que possuem ou não cópias da variante no gene *MYH1*, permitindo a seleção de animais para a reprodução, evitando a produção de potros afetados (FINNO et al., 2018; GIANINO et al., 2019).

2.1.6 Diagnósticos Diferenciais

Doenças que causam lesões e sintomatologia do sistema musculoesquelético em equinos, principalmente atletas, são diversas e comuns. Dentre os diagnósticos diferenciais para a atrofia muscular que caracteriza a IMM estão rabdomiólise induzida por esforço, miosite por agentes infecciosos, deficiência de vitamina E e selênio, má absorção e caquexia, miopatia imunomediada devido à púrpura hemorrágica, atrofia muscular neurogênica, miopatia mitocondrial e outras rabdomiólises induzidas por demais etiologias (BARROTT et. al, 2004; ALEMAN, 2008; VALBERG, 2018).

As enfermidades de origem genética que acomete a musculatura esquelética, também podem ser consideradas como diagnósticos diferenciais,

tais como as já descritas no QM no Brasil: *HYPP*, *PSSM1* e *MH* (DELFIOL et al., 2015; DELFIOL et al., 2018), e *GBED* (ALEMAN, 2008; ARAUJO et al., 2018).

2.1.7 Tratamento e Prognóstico

O uso de terapias como anti-inflamatórios esteroides (AIES), tem apresentado bons resultados no tratamento para IMM e a rabdomiólise não induzida por exercício. Os fármacos mais utilizados são a Dexametasona (0,07 a 0.1 mg/kg) ou Prednisolona (1mg/kg), que auxiliam no combate a atrofia muscular, a falta de apetite e letargia, podendo variar de acordo com a gravidade dos sinais clínicos e do estágio da doença, ou seja, quanto mais cedo iniciar o tratamento, maiores são as chances de recuperação (LEWIS et. al, 2007). Terapia com antibióticos para infecção concomitante podem ser combinados com os corticosteroides descritos anteriormente (VALBERG et al., 2020).

Em ambas as manifestações o prognóstico pode ser considerado favorável, sendo que 84% dos animais afetados apresentam recuperação após seis meses de acompanhamento com restabelecimento da massa muscular. Quando tratados de imediato os animais não apresentam danos a longo prazo, no entanto, devido à predisposição, em aproximadamente 50% dos casos há recidivas; ainda assim, os índices de resolução dos casos chegam a atingir 90% (HUNYADI et al., 2017).

2.2 Miopatia por Acúmulo de Polissacarídeo (*PSSM*)

A miopatia de armazenamento de polissacarídeos (*PSSM*) é uma forma específica de rabdomiólise por esforço em cavalos Quarto de Milha e raças relacionadas. A *PSSM* é classificada em *PSSM* tipo 1 (*PSSM1*), que se refere a cavalos com a variante específica do gene *GYS1*, e *PSSM* tipo 2 (*PSSM2*), que se refere aos cavalos que não possuem o alelo mutante, porém, apresentam sintomatologias e características histopatológicas semelhantes às encontradas nos animais com *PSSM1* (MCCUE et al., 2008; VALBERG et al., 2022). Apesar do objetivo deste trabalho ser o estudo da *PSSM1* para melhor entendimento da enfermidade, nesta revisão serão abordados os dois tipos de *PSSM*.

2.2.1 Etiologia

A característica marcante que levou à descoberta de *PSSM* foram os agregados de polissacarídeos resistentes à amilase observados na coloração positiva de ácido periódico-Schiff (PAS) do músculo esquelético (VALBERG et al., 2022). O PAS é uma técnica de coloração utilizada para identificar substâncias formadas por carboidratos, corando estruturas como membrana basal e micro-organismos (SANTOS & ALESSI, 2016). O glicogênio normal é sensível à amilase, o que significa que toda a coloração de PAS nas fibras musculares é removida após a adição da mesma, assim, quando ocorre a resistência à amilase é possível observar polissacarídeos presentes na coloração (VALBERG et al., 2022).

Em 2008, uma mutação dominante provocada pela variante *c.926G>A* no gene responsável pela síntese de glicogênio 1 (*GYS1*), foi identificada em QM que foram fenotipados por concentrações aumentadas de glicogênio muscular e resistente à amilase. Dos 99 animais que foram testados 72% possuíam a variante *GYS1* e 28% não (MCCUE et al., 2008). Isso levou o termo *PSSM* tipo 1 e *PSSM* tipo 2 já citados acima. Assim, o termo *PSSM2* é um distúrbio de armazenamento de glicogênio que causa rabdomiólise por esforço, possui lesões histopatológicas menos graves que o *PSSM1*, mas é mais sensível à digestão da amilase e tem menos material filamentoso na microscopia eletrônica do que o *PSSM1* (VALBERG et al., 2022).

2.2.2 Epidemiologia

Mais de 20 raças diferentes possuem a variante *GYS1* responsável pelo *PSSM1*. A maior prevalência (90%) ocorre em raças da Europa continental derivadas do cavalo Belga, que também apresentam alta prevalência de homozigotos. Em cavalos Quarto de Milha americanos, a prevalência de *PSSM1* é de 6 a 10%, sendo que a linhagem de conformação é a que mais prevalece (28% dos casos) (VALBERG et al., 2020).

No Brasil, ao se analisar a distribuição dos animais com alelos mutados, em heterozigose ou homozigose, nas linhagens esportivas do QM brasileiro, percebeu-se que animais com a mutação responsável pela *PSSM1* foram encontrados em maior frequência no QM de conformação (31,7%, 22/101), semelhante ao que foi visto nos QM americanos. Também foram evidenciados,

pela ordem, nas linhagens de rédeas (6,9%, 11/160), apartação (2,5%, 4/160), tambor e baliza (1,9%, 3/160) (DELFIOL et al., 2018).

2.2.3 Patogênese

Cavalos com *PSSM1* acumulam glicogênio em excesso nas fibras musculares de contração rápida tipo 2 IIA e IIX, devido a mutação no gene *GYS1* responsável pela síntese de glicogênio, acarreta a substituição de uma guanina por uma adenina resultando na troca da síntese de uma arginina por uma histidina (MCCUE et al., 2008).

A enzima glicogênio sintase converte o excesso de glicose livre na corrente sanguínea em glicogênio armazenado nos músculos e no fígado. Devido a posição da variante causar uma irregularidade na síntese de glicogênio, resulta em atividade excessiva do mesmo. Por não haver a mesma proporção de enzimas ramificadoras para a quebra do glicogênio, com o passar do tempo, os polissacarídeos se tornam menos ramificados, tornando-se resistente à digestão pela amilase (MCCUE et al., 2008; VALBERG et al., 2011).

A desregulação da síntese de glicogênio parece alterar a geração de energia nas fibras musculares durante o exercício em certas condições dietéticas que aumentam os níveis de insulina. Assim, cavalos *PSSM* com estimulação máxima da glicogênio sintase a partir de dietas ricas em carboidratos não estruturais podem ser incapazes de gerar Acetilcoenzima A suficiente, a partir do metabolismo de carboidratos ou gorduras para alimentar a contração muscular (VALBERG et al., 2011; VALBERG et al., 2020).

2.2.4 Manifestações clínicas e Patologia clínica

Os QM portadores de *PSSM1* podem ser saudáveis (assintomáticos) mesmo com evidências histológicas da doença. Os sinais clínicos de *PSSM1* ocorrem por volta dos 5 anos de idade, podendo variar entre 1 a 14 anos, e normalmente se iniciam durante ou após exercícios leves. Os sinais mais comuns são músculos rígidos e doloridos, fasciculações, fraqueza, sudorese e relutância em se locomover. Os membros pélvicos são mais comumente afetados, entretanto os músculos epaxiais, abdominais e dos membros torácicos também podem estar envolvidos. A manifestação de dor geralmente começa após 20 minutos de exercício e pode durar mais de duas horas, isso porque os

músculos dependem fortemente de glicogênio/glicose para obter energia durante sua atividade (MCCUE et al., 2009; VALBERG et al., 2011; VALBERG et al., 2020).

Em animais homozigotos para *PSS1* a sintomatologia se manifesta de forma mais grave em comparação aos animais heterozigotos (NAYLOR et al., 2012). Sendo que esses animais, quando associados à variante do gene receptor da rianodina 1 (*RYR1*) - que causa hipertermia maligna -, apresentam sinais clínicos mais evidentes e potencialmente fatais (MCCUE et al., 2009).

A maioria dos QM e raças relacionadas, com a mutação *GYS1* apresentam elevações nas enzimas CK e AST sérica. Cavalos gravemente afetados têm os valores médios de CK de 459 UI/L podendo chegar a mais de 35.000 UI/L durante os episódios agudos e, os valores médios de AST de 537 UI/L (VALBERG et al., 2011).

2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico é fundamentado com base no histórico de episódios recorrentes de miopatia, nas manifestações clínicas, junto com o aumento nos valores séricos de CK e AST, biópsia muscular e teste genético (MCCUE et al., 2008; NAYLOR et al., 2012).

O exame histopatológico fornece lesões características do *PSSM* em amostras de biópsias musculares, apresentando numerosos vacúolos subsarcolemais e inclusões densas, cristalinas, PAS-positivas e resistentes à amilase em fibras de contração rápida (MCCUE et al., 2009; VALBERG et al., 2011; VALBERG et al., 2020). A *PSSM2* parece ser uma nova glicogenose que só pode ser diagnosticada por histopatologia muscular (VALBERG et al., 2022). Desse modo, para diferenciar *PSSM1* de *PSSM2* é necessário a realização do teste genético, sendo a técnica padrão ouro para identificar a substituição de uma base nitrogenada G por A no éxon 6 do gene *GYS1* (MCCUE et al., 2008; VALBERG et al., 2020).

2.2.6 Diagnóstico diferencial

A *PSSM* é considerada um importante diagnóstico diferencial de miopatias, devido suas sintomatologias serem semelhantes a inúmeras outras patologias. Diversas anormalidades que acometem o sistema locomotor, atrofia

muscular e miopatia após exercício, incluindo também doenças relacionadas a nutrição como deficiência de vitamina E e selênio, e outras enfermidades genéticas principalmente a hipertermia maligna, são considerados diagnósticos diferenciais (VALBERG et al., 2011; VOTION, 2012).

2.2.7 Tratamento e prognóstico

A *PSSM* não possui tratamento específico, sendo realizado apenas suporte, cujo o objetivo é aliviar as dores musculares, bem como corrigir os déficits hidroeletrólíticos (VALBERG, 2018).

A primeira coisa a se fazer em cavalos com crises de rabdomiólise intensa é o uso de sedativos/analgésicos como acepromazina, xilazina ou, em cavalos mais doloridos, detomidina combinada com o opioide butorfanol. Em cavalos hidratados, medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (fenilbutazona ou flunixinina meglumina) podem proporcionar alívio da dor, mas o efeito não é tão imediato e eficaz quanto os sedativos/analgésicos. Para cavalos com extrema dor, infusão de detomidina, lidocaína ou butorfanol pode fazer a diferença entre o tempo adequado para recuperação e a eutanásia VALBERG et al., 2011; VALBERG et al., 2020).

Equinos com *PSSM* sempre estarão predispostos a apresentar sinais clínicos, porém com a adesão às recomendações de dieta e exercícios, cerca de 70% dos cavalos melhoram notavelmente os sinais clínicos e muitos retornam a níveis aceitáveis de desempenho (VALBERG et al., 2011). Em episódios graves e recorrentes o prognóstico é considerado desfavorável quanto ao desempenho atlético desses animais (VALBERG, 2018).

2.2.8 Manejo da dieta e programa de exercícios

É importante realizar uma dieta específica para cavalos com *PSSM*, com intuito de reduzir a carga de glicose e fornecer gordura como fonte alternativa de energia. Os proprietários relatam que, cuidadosamente, após aderirem este tipo de dieta, juntamente com adequado manejo de exercícios, seus animais melhoram significativamente (VALBERG et al., 2011).

As forragens contêm carboidratos estruturais (CE), que nos equinos são fermentados pelos micro-organismos do intestino grosso, dando origem a ácidos graxos voláteis, principalmente acético e butílico que podem ser transformados

em energia ou utilizados na síntese de gordura. O açúcar e o amido são carboidratos não estruturais (CNE), absorvidos no intestino delgado, como forma de glicose, ativando a síntese de glicogênio, podendo, então, desencadear as sintomatologias clínicas da doença (VALENTINE et al., 2001; VALBERG et al., 2020).

Cavalos com *PSSM1* devem ser alimentados com feno com menos de 12% de carboidratos não estruturais (CNE). A gordura pode ser adicionada à dieta na forma de óleos com baixo teor de amido (<15%) e alto teor de gordura (>10%). As gorduras de cadeia longa encontradas no óleo de milho e no farelo de arroz têm demonstrado diminuir a atividade sérica de CK pós-exercício em cavalos com *PSSM1* em estudos de dieta controlada (VALBERG et al., 2020).

Acredita-se que o efeito benéfico da redução do amido e do aumento da gordura causa menor absorção de glicose dentro das células musculares e fornece mais ácidos graxos livres sendo utilizados durante a execução do exercício (VALBERG, 2018; VALBERG et al., 2020). No entanto, estudos mostram que a dieta por si só não é suficiente, e que é preciso somar com um programa de exercícios para que os cavalos possam mostrar melhora no quadro clínico (VALBERG et al., 2011).

Recomenda-se que antes de iniciar um programa de exercícios, os animais tenham cerca de duas semanas para se adaptar a uma nova dieta. No início, é indicado menos de 10 minutos de corrida, com aumento gradual e constante. Forçar o cavalo a fazer exercícios mais intensos muitas vezes leva a um episódio de rabdomiólise e frustração para o proprietário. Normalmente, o trabalho na cela pode ser iniciado após três semanas de adaptação, aumentando gradativamente (VALBERG et al., 2012). A elevação sérica subclínica da CK é bastante comum após a reintrodução do exercício, e o retorno aos níveis normais geralmente leva de quatro a seis semanas após o início das atividades. É importante manter os cavalos com *PSSM* em boa forma para prevenir novos episódios de rabdomiólise (VALBERG, 2018; VALBERG et al., 2020).

2.3 Paralisia Periódica Hipercalêmica (HYPP)

A paralisia periódica hipercalêmica (HYPP) foi a primeira doença genética específica e detectável por tecnologia de DNA em equinos. É uma doença autossômica codominante de miotonia em QM, Appaloosas e Paint Horses,

sendo que as duas últimas, possuem a raça QM em sua composição. O *HYPP* é devido a uma mutação no gene que codifica o canal de sódio da musculatura esquelética (RUDOLPH et al., 1992).

2.3.1 Etiologia e Epidemiologia

A doença ficou conhecida como “síndrome do Impressive”, uma vez que, os animais portadores da variante responsável pela *HYPP* possuem um ancestral em comum, o garanhão “Impressive”, muito utilizado na linhagem de conformação (NAYLOR, 1994).

A *HYPP* causa uma mutação no cromossomo 11 que provoca a substituição de uma citosina por uma guanina no gene *SCN4A* do canal de sódio, levando a uma falha na ativação desses canais quando as concentrações séricas de potássio estão elevadas. O resultado é um fluxo excessivo de entrada de sódio e saída de potássio, levando à despolarização persistente das células musculares e fraqueza transitória (NAYLOR, 1994; VALBERG, 2018).

Os cavalos afetados foram referencialmente selecionados para reprodução devido a característica fenotípica de hipertrofia muscular. Nenhuma mudança na prevalência da mutação *HYPP* ocorreu em cavalos QM de conformação desde a descoberta da mutação genética em 1992, isso provavelmente pode ser explicado devido a persistência de manter o fenótipo desejável, que esses animais mutados apresentam (VALBERG et al., 2020). Estudo realizado em QM no Brasil, mostra que a prevalência da mutação responsável pelo *HYPP* foi de (30,7%, 31/101), encontrados apenas na modalidade de conformação (DELFIOL et al., 2015).

2.3.2 Patogênese

Para ocorrer a contração muscular, através de um estímulo nas células, os canais de sódio são normalmente ativados brevemente para permitir a entrada transitória de sódio dentro das células durante a fase inicial (despolarização) do potencial de ação. Isso faz com o que a célula fique com mais carga positiva, ocorrendo as ações de contração muscular. Em seguida, os canais de sódio são fechados e abrem-se os canais de potássio, saindo do meio intracelular para o extracelular, e, por ter carga positiva, a célula retorna a ficar com carga negativa (KLEIN, 2014).

Quando as células musculares começam a despolarizar durante um episódio de *HYPP*, uma subpopulação de canais de sódio não é inativada, produzindo um fluxo intracelular excessivo de sódio e um fluxo extracelular de potássio, resultando em despolarização persistente das células musculares, tornando-se os músculos excessivamente excitáveis e com contrações involuntárias. A inativação parece ser mais pronunciada quando há elevação do nível de potássio externo, que ocorre devido a dietas ricas nesse mineral (RUDOLPH et al., 1992; VALBERG, 2018; VALBERG et al., 2020).

2.3.3 Sinais Clínicos e Patologia Clínica

Os sinais clínicos de *HYPP* ocorrem, geralmente, em cavalos de 2 a 3 anos de idade, manifestando tanto em heterozigotos (N/H) como em homozigotos (H/H), sendo que o último apresenta sinais clínicos mais graves (RUDOLPH et al., 1992). Os sinais variam amplamente em cavalos N/H, desde assintomáticos até episódios diários de fasciculações e fraqueza muscular. Em crises leves, os cavalos permanecem em posição quadrupedal, entretanto, em situações mais graves, podem apresentar taquicardia e taquipneia, fraqueza generalizada adquirindo posição de cão sentado e até decúbito, aparentam paralisados, mas permanecendo totalmente conscientes (FINNO, et al., 2009; VALBERG, 2018; VALBERG et al., 2020).

Alguns fatores são causas comuns para desencadear episódio de *HYPP*, tais como: alimentos ricos em potássio, jejum intermitente, anestesia/sedação intensa, transporte e estresse. O exercício não parece induzir sinais clínicos e os episódios podem durar entre 15 a 60 minutos (RUDOLPH et al., 1992; MICKELSON & VALBERG 2015).

Durante as crises, a maioria dos cavalos apresenta hipercalemia 6–9 mmol/l, (referência para espécie 3,0 a 5,0 mmol/l) (CONSTABLE et al., 2017), hemoconcentração e hiponatremia leve com equilíbrio ácido-base normal. A concentração sérica de potássio atinge a normalidade ao final das crises, entretanto, em episódios brandos a concentração sérica pode permanecer normal. A CK geralmente está normal ou discretamente aumentada durante os episódios de fasciculações e fraqueza (VALBERG et al., 2020).

2.3.4 Diagnóstico e Diagnóstico Diferencial

Animais descendentes do garanhão Impressive, que apresentam sintomatologias descritas anteriormente é altamente sugestivo de *HYPP*. O exame eletromiográfico de cavalos afetados tem sido utilizado para fins de diagnóstico, apresentando potenciais de fibrilação anormais, descargas repetitivas complexas e potenciais miotônicos ocasionais, mesmo entre os episódios. Entretanto, o teste genético é o diagnóstico definitivo para a variante *F1416L* no gene *SCN4A* (RUDOLPH et al., 1992).

Devem ser considerados diagnósticos diferenciais para *HYPP* outras causas de colapso, mas também a síndrome cólica, laminite, tétano e outras miopatias que possam levar a tremor muscular e decúbito (RUDOLPH et al., 1992; FINNO et al., 2009). Como esta é uma característica dominante, cruzar um cavalo afetado com um cavalo normal resulta em 50% de chance de produzir um potro com *HYPP*. (VALBERG, 2018; VALBERG et al., 2020).

2.3.5 Tratamento e Prognóstico

Em caso leves e esporádicos de *HYPP* não é necessário o tratamento, podendo ser revertidos precocemente com a alimentação de grãos ou xarope de milho para estimular o movimento de potássio nas células mediado pela insulina. Exercícios leves também são indicados para interromper crises brandas. Muitos cavalos se recuperam espontaneamente (VALBERG et al., 2020).

Em episódios graves, é indicado a administração de gluconato de cálcio (0,2–0,4 mL/kg de solução a 23% gluconato de cálcio diluída em um litro de dextrose a 5%), isso faz com o que aumente a concentração extracelular de cálcio, conseqüentemente, eleva o limiar do potencial da membrana muscular o que diminui sua excitabilidade. Outra alternativa, para induzir o potássio intracelular, é a utilização de dextrose intravenosa (6 mL/kg de uma solução a 5%) isoladamente ou combinada com bicarbonato de sódio (1–2 mEq/kg) (FINNO et al., 2009).

HYPP é um distúrbio controlável na maioria dos casos, sendo considerado o prognóstico de reservado a bom, no entanto episódios recorrentes podem acontecer e dependendo da intensidade dos sinais clínicos podem ser fatais (VALBERG et al., 2020).

2.3.6 Dieta

O uso de dietas restritas de potássio, é geralmente o manejo mais importante para animais com *HYPP*. Cavalos com episódios recorrentes devem consumir uma dieta balanceada entre 0,6% e 1,1% de concentração total de potássio por dia, em vista disso, cada refeição deve conter até 33 gramas desse mineral (FINNO et al., 2009; VALBERG et al., 2020).

É preferível analisar a quantidade de potássio nas forragens antes de serem oferecidas aos animais, visto que é a fonte mais comum desse elemento. Evitar alimentos ricos em melaço e suplementos contendo eletrólitos e/ou algas marinhas. O pastejo não precisa ser restringido, pois o consumo gradual de gramíneas, com alto teor de água, evita o aumento das concentrações de potássio no sangue (FINNO et al., 2009; VALBERG et al., 2020).

Medicamentos que ajudam excretar o potássio via renal, como Acetazolamida (2–3 mg/kg a cada 8–12h por via oral) ou Hidroclorotiazida (0,5–1 mg/kg a cada 12h por via oral), podem ser uma alternativa em casos que o manejo dietético não seja suficiente para o controle das crises (VALBERG et al., 2020).

2.4 Hipertermia Maligna (MH)

A hipertermia maligna (*MH*) é um distúrbio farmacogenético que se manifesta como uma resposta hipermetabólica a agentes inalatórios potentes, (como halotano, isoflurano, sevoflurano, desflurano), ao relaxante muscular despolarizante succinilcolina e menos frequentemente a fatores de estresse (ROSENBERG et al., 2015).

2.4.1 Etiologia e Epidemiologia

A base genética da *MH* ligada a variantes no receptor rianodina 1 (*RYR1*) foi relatada em humanos (MCCARTHY et al., 1990), porcos (FUJII et al., 1991), cães (ROBERTS et al., 2001) e em equinos (ALEMAN et al., 2004). Em cavalos, a *MH* é uma doença genética autossômica dominante, caracterizada pela substituição de uma citosina por uma guanina no éxon 46, no ponto c.7360C>G no gene receptor de rianodina *RYR1* (ALEMAN et al., 2009).

A *MH* é uma doença rara em equinos, encontrada em menos de 1% dos 24.000 testes genéticos para *MH* em cavalos QM e Paint Horse, sendo esses, heterozigotos (M/N) para a variante (VALBERG et al., 2020). No Brasil, um

estudo feito para avaliar a distribuição de QM com alelos mutados para *MH*, mostrou que não foi identificada em 741 QM de diferentes linhagens esportivas (DELFIOL et al., 2018).

2.4.2 Patogênese

Em condições normais, o canal de liberação de cálcio (Ca^{2+}) codificado pelo receptor rianodina é o principal mecanismo pelo qual o cálcio estocado nas cisternas do retículo sarcoplasmático é liberado no sarcoplasma para iniciar a contração dos miofilamentos (KLEIN, 2014).

Uma mutação *missense* C7360G no gene *RYR1* desenvolve episódios fatais de *MH* desencadeados por indutores descritos anteriormente. Na crise de *MH*, há uma intensa alteração na homeostasia do cálcio, na qual a hiperativação do *RYR1* provoca um aumento na concentração de cálcio citoplasmático, o que resulta na ativação sustentada da contração muscular (ROSENBERG et al., 2015). A contração muscular e a reabsorção do excesso de Ca^{2+} consomem grandes quantidades de ATP gerando intenso calor (hipertermia). O consumo dos estoques de ATP resulta no rompimento da membrana da musculatura e há extravasamento dos constituintes celulares, entre eles o potássio, que em grande quantidade extravascular leva ao quadro de acidose metabólica (CORREIA et al., 2012).

Outra consequência da diminuição de ATP é a rigidez muscular, uma vez que o ATP é necessário para permitir o relaxamento muscular. O aumento do consumo de oxigênio por meio da glicólise e do metabolismo aeróbico descontrolado leva um quadro de hipóxia celular, acidose láctica e excesso de geração de dióxido de carbono (CORREIA et al., 2012; MICKELSON & VALBERG, 2015). A homozigose parece ser letal devido nenhum cavalo adulto homozigoto ser relatado (VALBERG et al., 2020).

2.4.3 Sinais Clínicos e Patologia Clínica

Devido as consequências que a variante pode desencadear durante uma crise de *MH*, os sinais clínicos evidentes incluem taquicardia, taquipneia, hipertermia, que pode exceder 43°C, prolapso de terceira pálpebra, trismo mandibular, sudorese intensa, rigidez muscular e rabdomiólise (ALEMAN et al., 2009; MICKELSON & VALBERG, 2015).

Durante a anestesia, em cavalos com *MH*, foram relatados, além dos citados acima, sinais como hipercapneia e acidose metabólica (ALEMAN et al., 2009). Em um estudo, dois cavalos portadores da variante foram anestesiados com halotano, as sintomatologias iniciaram aproximadamente 60 minutos após o uso do agente inalatório, a morte ocorreu por parada cardiorrespiratória e profundo *rigor mortis* quase que imediato (ALEMAN et al., 2009).

Por levar rapidamente a óbito, as alterações hematológicas medidas logo após a morte dos animais incluíram hemoconcentração, hipercalemia, hipercalcemia, hiperfosfatemia, hiperglicemia e aumento do nível de creatinina, devido ao rompimento das células musculares. A concentração sérica de CK apresentou aumento, não tanto significativo, e o nível de mioglobina foi relatado 10 vezes maior do que é a referência para a espécie (VALBERG et al., 2020).

2.4.4 Diagnóstico

Equinos submetidos a procedimentos anestésicos, apresentando hipertermia rápida e progressiva, hipercapnia e acidose, são sugestivos a terem a variante responsável pela *MH* (ALEMAN et al., 2009). Entretanto, o padrão ouro para o diagnóstico da *MH* é o teste genético, onde é possível identificar a substituição de base C para G no éxon 46 do gene *RYR1*. O teste pode ser realizado por PCR (ALEMAN et al., 2004) ou por PCR em tempo real (qPCR) (NIETO & ALEMAN, 2009), sendo que o último tem a vantagem da rapidez do resultado, o que permite que seja feita antes do procedimento anestésico, principalmente por se tratar de uma enfermidade fatal (NIETO & ALEMAN, 2009).

2.4.5 Diagnóstico Diferencial

Durante o procedimento anestésico, deve ser levado em consideração outras causas de hipertermia, como temperatura ambiente ou a utilização de circuito inalatório fechado, no entanto, em casos de *MH* a temperatura chega próximo de 43°C e isso, dificilmente ocorre em outras circunstâncias (NIETO & ALEMAN, 2009). Outras miopatias por esforço ou não, relacionadas ou não com alterações genéticas, que levam a quadros de rigidez muscular, podem ser consideradas como diagnósticos diferenciais para *MH* (ALEMAN et al., 2009).

2.4.6 Tratamento e Prognóstico

A ação mais importante para o tratamento é retirar imediatamente o fator que desencadeou a crise de *MH* (ALEMAN et al., 2009). A utilização do dantroleno sódico tem como objetivo se ligar ao *RyR1*, agindo como relaxante muscular e como antagonista do cálcio. A dose recomendada para equinos é de 4 mg/kg, podendo ser utilizado a cada 6 horas até que a atividade sérica da CK diminua, entretanto é um medicamento de alto custo e não é disponível em todos os hospitais/clínicas veterinárias. Outros meios para controlar a hipertermia e a acidose incluem aplicação externa de álcool, ventiladores e fluidos intravenosos resfriados (VALBERG et al., 2020).

Em equinos portadores da variante responsável pela *MH*, o prognóstico é de reservado a desfavorável, considerando a taxa de 34% de letalidade (ALEMAN et al., 2009). O tratamento adequado durante a manifestação dos sinais clínicos aumenta a chance de sobrevivência dos equinos (CARPENTER, 2006), no entanto, uma vez que ocorre o episódio fulminante sob anestesia, é difícil prevenir a parada cardíaca (VALBERG et al., 2020).

2.5 Considerações gerais

Apresentada as características das quadro doenças genéticas musculares (*MYHM*, *PSSM1*, *HYPP*, *MH*), observando as frequências alélicas, exposta na revisão de literatura, na população de QM brasileiro de linhagens esportivas de apartação, conformação, corrida, rédeas e tambor, e como, esses dados têm similaridade com as frequências observadas no Estados Unidos da América, neste sentido, pode ser que com o QM de vaquejada não seja tão diferente; contudo, assim como ocorre nas demais linhagens esportivas, especula-se que alguma dessas enfermidades possa ser mais predominante na linhagem de vaquejada.

3. Objetivo

Diante do exposto e pela importância dos cavalos de vaquejada no país, esta pesquisa visa ampliar o conhecimento quando se refere a doenças genéticas em cavalos QM de vaquejada brasileiro, como objetivo de avaliar as frequências alélicas das enfermidades *MYHM*, *PSSM1*, *HYPP* e *MH* em QM registrados na ABQM com histórico de competidor de vaquejada.

4. Referências

ABQM, 2020. Associação brasileira de criadores de cavalos quarto de milha. Disponível em: <<https://www.abqm.com.br/noticias/abqm-esclarece-duvidas-sobre-as-principais-mudancas-no-regulamento-do-srgcqm>>. Acesso em 20 de agosto 2023.

ABQM, 2022. Associação brasileira de criadores de cavalos quarto de milha. Disponível em: <<https://abqm.com.br/noticias/vaquejada-movimenta-mais-de-r-800-milhoes-por-ano-estima-abvag>>. Acesso em 20 de agosto 2023.

ALBUQUERQUE, A.L.; DELFIOL, D.J.Z.; ANDRADE, D.G.A.; ALBERTINO, L.G.; SONNE, L.; BORGES, A.S.; VALBERG, S.J.; FINNO, C.J.; OLIVEIRA-FILHO, J.P. Prevalence of the E321G MYH1 variant in Brazilian Quarter Horses. *Equine Vet J.*, v.00, p.1–6, 2021.

ALEMAN, M. A review of equine muscle disorders. *Neuromuscular Disorders.*, v.18, n.4, p.277-287, 2008.

ALEMAN, M.; NIETO, J.E.; MAGDESIAN, K.G. Malignant hyperthermia associated with ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, v.23, p.329-334, 2009.

ALEMAN, M.; RIEHL, J.; ALDRIDGE, B.M.; LECOUNTEUR, R.A.; STOTT, J.L.; PESSAH I.N. Association of a mutation in the ryanodine receptor 1 gene with equine malignant hyperthermia. *Muscle Nerve.*, v.30, p.356-365, 2004.

ALEMAN, M.; SCALCO R, MALVICK, J.; GRAHN, R. A.; TRUE, A.; BELLONE, R. R. Prevalence of Genetic Mutations in Horses with Muscle Disease from Neuromuscular Disease Laboratory. *J Equine Vet Sci.*, v.118, n. 104129, 2022.

ALESSI, C.A.; SANTOS, R.L. de.; *Patologia veterinária*. 2 ed. Brasil: Roca, 2016. 1346p.

ARAUJO, C.E.; DELFIOL, D.J.; BADIAL, P.R.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; ARAUJO-JUNIOR, J.P.; BORGES, A.S. Prevalence of the Glycogen Branching Enzyme Deficiency Mutation in Quarter-Horses in Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science.*, v.62, p. 81-84, 2018.

BARROTT, M.J.; BROOKS, H.W.; MCGOWAN, C.M. Suspected immunemediated myositis in a pony. *Equine Veterinary Education.*, v.16, n.2, p. 58-61, 2004.

BRITO FILHO, F.R.M. Perfil da criação de equinos competidores de vaquejada. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso em Zootecnia - Universidade Federal da Paraíba, Areia.

CARPENTER, R.E. Complications and emergencies. Malignant hypertermia. In: DOHERTY, T.; VALVERDE, A. *Manual of Equine Anesthesia and Analgesia*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. chap. 21, p.305 -337.

CORREIA, A.C.C.; SILVA, P.C.B.; SILVA, B.A. Hipertermia maligna: Aspectos Moleculares e Clínicos. *Rev Bras Anesthesiol.*, V.62, N.6, p.820-837, 2012.

COELHO, C.S.; LOPES, P.F.R.; PISSINATI, G.L.; RAMALHO, L.O.; SOUZA, V.C. Influência do exercício físico sobre sódio e potássio séricos em equinos da raça Quarto de Milha e mestiços submetidos à prova de laço em dupla. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária.*, v.18, n.1, p.32–35, 2011.

CONSTABLE, P.D.; HINCHCLIFF, K.W.; DONE, S.H.; GRUNBERG, W. *Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos e Caprinos*. Ed. 11. Guanabara Koogan, 2017. 2308p.

DELFIO, D.J.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; BADIAL, P.R.; BATTAZZA, A.; ARAUJO-JUNIOR, J.P.; BORGES, A.S. Estimation of the allele frequency of type 1 polysaccharide storage myopathy and malignant hyperthermia in Quarter Horses in Brazil. *J Equine Vet Sci.*, v.70, p.38-41, 2018.

DELFIOL, D.J.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; BATTAZZA, A.; SOUZA, C.P.; BADIAL, P.R.; BORGES, A.S. Prevalence of the hypercalemic periodic paralysis mutation in Quarter-Horses in Brazil. *Cienc Rural.*, v.45, n.5, p.854-857, 2015.

FINNO, C. J.; SPIER, S. J.; VALBERG, S. J. Equine diseases caused by known genetic mutations. *The Veterinary Journal.*, v. 179, n.3, p. 336-347, 2009.

FINNO, C.J.; GIANINO, G.; PERUMBAKKAM, S.; WILLIAMS, Z.J.; BORDBARI, M.H.; GARDNER, K.L.; BURNS, E.; PENG, S.; DURWARD-AKHURST, S.A.; VALBERG, S.J. A missense mutation in *MYH1* is associated with susceptibility to immune-mediated myositis in Quarter-Horses. *Skelet Muscle.*, v.8, n.1, p.7, 2018.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DE LEON S.; KHANNA, V. K.; WEILER, J. E.; O'BRIEN, P. J.; MACLENNAN, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science.*, v. 253, p. 448-451, 1991.

GIANINO, G.M.; VALBERG, S.J.; PERUMBAKKAM, S.; HENRY, M.L.; GARDNER, K.; PENEDO, C.; FINNO, C.J. Prevalence of the E321G MYH1 variant for immune-mediated myositis and nonexertional rhabdomyolysis in performance subgroups of American Quarter Horses. *J Vet Intern Med.*, v.33, n.2, p.897-901, 2019.

HUNYADI, L.; SUNDMAN, E.A.; KASS, P.H.; WILLIAMS, D.C.; ALEMAN, M. Clinical implications and hospital outcome of immune-mediated myositis in horses. *J Vet Intern Med.*, v.31, n.1, p.170-175, 2017.

KLEIN B.G. *Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 624p.

LEWIS, S.S.; VALBERG, S.J.; NIELSEN, I.L. Suspected immune-mediated myositis in horses. *J Vet Intern Med.*, v.21, n.3, p. 495-503, 2007.

MCCARTHY, T.V.; HEALY, J.M.; HEFFRON, J.J.; LEHANE, M.; DEUFEL, T.; LEHMANN-HORN, F.; FARRAL, M.; JOHNSON, K. Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome. *Nature*. v.343, p. 562-564, 1990.

MCCUE, M.E.; ARMIÉN, A.G.; LUCIO, M.; MICKELSON, J.R.; VALBERG, S.J. Comparative skeletal muscle histopathologic and ultrastructural features in two forms of Polysaccharide Storage Myopathy in horses. *Veterinary Pathology*., v.46, p.1281-1291, 2009.

MCCUE, M.E.; VALBERG, S.J.; MILLER, M.B.; WADE, C.; DIMAURO, S.; AKMAN, H.O.; MICKELSON, J.R. Glycogen synthase (GYS1) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenosis. *Genomics*., v.91, p.458-466, 2008.

MICKELSON, J.R.; VALBERG, S.J. The Genetics of Skeletal Muscle Disorders in Horses. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, v.3, p.197-217, 2015.

NAYLOR, J.M. Equine hiperkalemic periodic paralysis: Review and implications. *Canadian Veterinary Journal*., v.35, p.279-285, 1994.

NAYLOR, R.J.; LIVESEY, L.; SCHUMACHER, J.; HENKE, N.; MASSEY, C.; BROCK, K.V.; FERNANDEZ FUENTES, M.; PIERCY, R. Allele copy number and underlying pathology are associated with subclinical severity in equine type 1 polysaccharide storage myopathy (PSSM1). *Plos One*., v.7, n.7, e42317, 2012.

NIETO, J.E.; ALEMAN, M. A rapid detection method for the ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*., v. 23, p. 619-622, 2009.

PAHLMAN, L.I.; MORGELIN, M.; ECKERT, J.; JOHANSSON, L.; RUSSELL, W.; RIESBECK, K.; SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L.; NORRBY-TEGLUND, A.; RALF R. SCHUMANN, R.R.; LARS BJORCK, L.; HERWALD, H. Streptococcal M Protein: A Multipotent and Powerful Inducer of Inflammation. *The Journal of Immunology*., v. 177, n. 2, p. 1221–1228, 2006.

PPM, 2020. Pesquisa da Pecuária Municipal. Comunicado técnico. Disponível em: <https://cnabrazil.org.br/storage/arquivos/Comunicado-Tecnico-CNA-ed30_2021.pdf>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.

RIVERO, J.L.; HILL, E.L. Skeletal muscle adaptations and muscle genomics of performance horses. *The Vet Journal.*, v. 209, p. 5–13, 2016.

ROBERTS, M.C.; MICKELSON, J.R.; PATTERSON, E.E.; NELSON, T.E.; ARMSTRONG, P.J.; BRUNSON, D.B.; HOGAN, K. Autosomal dominant canine malignant hyperthermia is caused by a mutation in the gene encoding the skeletal muscle calcium release channel (RYR1). *Anesthesiology.*, v. 95, p. 716-725, 2001.

ROSENBERG H.; POLLOCK, N.; SCHIEMANN, A.; BULGER, T.; STOWELL, K. Malignant hyperthermia: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases.*, v.4, p.10-93, 2015.

ROTHWELL, S., COOPER, R. G., LAMB, J. A., CHINOY, H. Entering a new phase of immunogenetics in the idiopathic inflammatory myopathies. *Current opinion in rheumatology.*, v.25, n.6, p. 735-741, 2013.

RUDOLPH, J.A.; SPIER, S.J.; BYRNS G.; ROJAS, C.V.; BERNOCO, D.; HOFFMAN, E.P. Periodic paralysis in Quarter Horses: A sodium channel mutation disseminated by selective breeding. *Nature Genetics.*, v.2, p.144-147, 1992.

SPONSELLER, B. T.; GG, S. J.; TENNENT-BROWN, B. S.; FOREMAN, J. H., KUMAR, P.; TIMONEY, J. F. Severe acute rhabdomyolysis associated with *Streptococcus equi* infection in four horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 227, n.11, p.1800-1807, 2005.

SPONSELLER, B.T.; WONG, D.M.; RUBY, R.; WARE, W.A.; WILSON, S.; HAYNES, J.S. Systemic calcinosis in a Quarter Horse gelding homozygous for a myosin heavy chain 1 mutation. *J Vet Intern Med.*, v.36, p.1543–1549, 2022.

TRYON, R.C.; PENEDO, M.C.T.; MCCUE, M.E.; 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, p.120- 125, 2009.

TRYON, R.C.; STEPHEN, D.; WHITE, S.D. Homozygosity mapping approach identifies a missense mutation in equine cyclophilin B (PPIB) associated with HERDA in the American Quarter Horse. *Genomics.*, v.90, p.93-102, 2007.

VALBERG, S.J. Disorders of the Musculoskeletal System. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M.; SELLON, D.C. *Equine Internal Medicine*. 4 ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018, chap.10, p.466-431.

VALBERG, S.J. Genetics of equine muscle disease. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, v.36, n.2, p.353-378, 2020.

VALBERG, S.J.; HENRY, M.L.; PERUMBAKKAM, S.; GARDNER, K.L.; FINNO, C.J. An E321G MYH1 mutation is strongly associated with nonexertional rhabdomyolysis in Quarter-Horses. *J Vet Intern Med.*, v.32, n.5, p.1718-1725, 2018.

VALBERG, S.J.; MCCUE, M.E.; MICKELSON, J.R. The interplay of genetic, exercise, and nutrition in Polysaccharide Storage Myopathy. *Journal of Equine Veterinary Science*. v. 31, p. 205-210, 2011.

VALBERG, S.J.; WILLIAMS, Z.J.; FINNO, C.J.; SCHULTZ, A.; VELEZ IRIZARRY.; HENRY, M.L.; GARDNER, F.; PETERSEN, J.L. Type 2 polysaccharide storage myopathy in Quarter Horses is a novel glycogen storage disease causing exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet J.*, p.1-14, 2022.

VALENTINE, B.A.; VAN SAUN, R.J.; THOMPSON, K.N.; HINTZ, H.F. Role of dietary carbohydrate and fat in horses with equine Polysaccharide Storage

Myopathy. *Journal of the American Veterinary Medical Association.*, v. 219, n. 11, p. 1537-1544, 2001.

VOTION, D. M. The story of equine atypical myopathy: A review from the beginning to a possible end. *ISRN Veterinary Science.* v. 2012, 2012.

WARD, T.L.; VALBERG, S.J.; ADELSON, D.L.; ABBEY, C.A.; BINNS, M.M.; MICKELSON, J.R. Glycogen branching enzyme (GBE1) mutation causing equine glycogen storage disease IV. *Mammalian Genome.*, v. 15, p. 570-577, 2004.

CAPÍTULO II

1 **Trabalho científico**

2 O Trabalho a seguir foi redigido conforme as normas da revista “Journal of
3 Equine Veterinary Science (JEVS)”
4 Original Research

5

6 **ALLELE FREQUENCY OF MUSCULAR GENETIC DISORDERS IN BULL-**
7 **CATCHING (VAQUEJADA) QUARTER HORSES**

8

9 Lídia Maria Santos Sperandio^a; Glauder Rocha Lago^a; Lukas Garrido Albertino^a, César
10 Erineudo Tavares de Araújo^b; Cíntia Ferreira^c, Alexandre Secorun Borges^a, José Paes de
11 Oliveira-Filho^{a*}

12 ^aDepartment of Veterinary Clinical Science, School of Veterinary Medicine and Animal
13 Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

14 ^bUniversity Center “Doutor Leão Sampaio” (UNILEÃO) – Juazeiro do Norte, Ceará,
15 Brazil

16 ^cGroup “Ser Educacional” (UNINASSAU) – Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

17

18 *Corresponding author: José Paes de Oliveira-Filho, R. Dr. Walter Mauricio Correa,
19 s/n,18618-81, Botucatu, São Paulo, BR. Tel. : +55-14-38802083

20 E-mail address: jose.oliveira-filho@unesp.br

21 **HIGHLIGHTS**

- 22 • The initial study on muscular disorder variants in Brazilian bull-catching (*vaquejada*)
- 23 QH.
- 24 • MYHM, PSSM1, HyPP, and MH variants were studied in *vaquejada* QH.
- 25 • The main variants in *vaquejada* QH were MYHM and PSSM.
- 26 • HYPP and MH variants are not major factors in *vaquejada* QH.

27 **ABSTRACT:**

28 Quarter horses (QH), a prominent athletic breed in Brazil, are susceptible to performance-
29 affecting muscular genetic disorders such as myosin-heavy chain myopathy (MYHM),
30 polysaccharide storage myopathy (PSSM1), hyperkalemic periodic paralysis (HyPP), and
31 malignant hyperthermia (MH). Bull-catching (*vaquejada*), a significant equine discipline
32 in the Brazilian Northeast, primarily involves QH and holds importance as a sport. Since
33 the allele frequencies (AF) of MYHM, PSSM1, HyPP, and MH in *vaquejada* QH remain
34 unknown, this study aims to evaluate the AF in 129 QH *vaquejada* athletes, specifically
35 from the Brazilian Northeast. These variants were exclusively observed in heterozygosity.
36 Among these variants, MYHM exhibited the highest AF (0.04 ± 0.01), followed by
37 PSSM1 (0.01 ± 0.01) and the HyPP variant (0.004 ± 0.01). Previously, the prevalences of
38 MYHM and PSSM1 variants were predominantly observed in reining (0.11 ± 0.02) and
39 halter (0.18 ± 0.04) Brazilian QH, respectively. The AF of MYHM and PSSM1 observed
40 in *vaquejada* QH were similar to those previously observed in barrel racing and cutting
41 ($AF_{MYHM} = 0.05$ and 0.03) as well as reining ($AF_{PSSM1} = 0.02$) in Brazil. Consistent with
42 previous studies carried out in Brazil, the MH variant was not identified in this study. As
43 one might suspect, the AF of these variants in *vaquejada* QH were similar to those
44 previously observed in Brazilian QH from other disciplines. Nevertheless, this study
45 marks the inaugural identification of these variants in *vaquejada* QH, highlighting the
46 imperative necessity to implement measures to halt the transmission of pathogenic alleles,
47 thereby mitigating the occurrence of clinical cases of these genetic diseases.

48 **Keywords:** MYHM, PSSM1, HyPP, MH, myopathy, horse

49 1. Introduction

50 The Brazilian equestrian industry holds significant economic and social
 51 importance. Among the athletic breeds, Quarter Horses (QH) stand out as prominent
 52 participants in Brazilian equestrian sports [1]. A noteworthy discipline within the
 53 Brazilian equine sphere is bull catching, known as *vaquejada*, characterized by high-
 54 intensity, short-duration exercises [2]. *Vaquejada*, a cultural sport in the Northeast region
 55 of Brazil, originated from the necessity of local cowboys to catch bulls without using
 56 ropes, a necessity arising from the unique characteristics of the ecosystem (*caatinga*) [2,
 57 3]. During the *vaquejada* competition, two cowboys on their horses collaborate to bring
 58 down a bull after a 100-meter sprint within 15 seconds [2, 3]. Hence, *vaquejada* horses
 59 undergo rigorous physical demands necessitating a flawless muscular system, among
 60 others, to achieve optimal performance [2].

61 Muscular disorders play a substantial role in athletic performance and health in
 62 these horses, and it has been reported that genetic selection focused on muscular strength,
 63 speed, and resistance could contribute to hereditary dysfunctions [4,5]. Hyperkalemic
 64 periodic paralysis (HyPP) [6], malignant hyperthermia (MH) [7], polysaccharide storage
 65 myopathy type 1 (PSSM1) [8], and myosin heavy chain myopathy (MYHM) [9,10]
 66 represent the primary genetic muscular disorders identified in QH. All these disorders
 67 have an autosomal inheritance pattern, with PSSM1 and MH displaying dominance, while
 68 HYPP and MYH1 exhibit codominant inheritance [6-9].

69 The allele frequencies of these variants have been previously studied in various
 70 disciplines, including halter, reining, cutting, racing, and barrel racing, particularly among
 71 QH from stud farms located in the Southern and Southeastern regions of Brazil [11-13].
 72 HyPP and PSSM1 variants were predominantly observed in 31% and 32% of halter QHs,
 73 respectively [11, 12]. In reining QH, MYHM was notably prevalent at 22% [13]. PSSM1
 74 and MYHM were also identified in smaller proportions across other disciplines [12, 13].
 75 However, the variant c.7360C>G observed in *RYR1*, responsible for MH, was absent in
 76 all lineages studied in Brazil [12].

77 Although since 2020, the Brazilian Association of Quarter Horses (ABQM) has
 78 required a genetic test for five specific disorders (HyPP, MH, PSSM1, GBED, and
 79 HERDA) for all stallions used in breeding [14]. However, the absence of prior studies
 80 evaluating these variants in *vaquejada* QH creates a knowledge gap regarding the actual
 81 allelic frequency of these variants in *vaquejada* QH. Consequently, this study aims to

82 assess the allele frequencies of these variants in QH *vaquejada* athletes, specifically those
83 from the Brazilian Northeast.

84

85 **2. Materials and Methods**

86 **2.1 Ethics approval and consent to participate in the study**

87 This study was approved on November 17, 2021, by the Institutional Animal Care
88 and Use Committee (217/2021- CEUA - UNESP). The sampling was performed under a
89 strict confidentiality agreement to ensure the anonymity of establishments, owners and
90 animals.

91

92 **2.2 Animal selection and sample collection**

93 The sampling calculation was performed using OpenEpi software (version 3.0.1);
94 given the population of 134,000 *vaquejada* QH [15], the estimated prevalence of MYH1
95 (7%) [13], PSSM1 (7%) [12], HyPP (4%) [11], and MH (1%) [5], respectively, with a
96 5% margin of error. Hair samples were collected randomly from 129 healthy QH from
97 the Brazilian Northeast. To be included in this study, horses had to be registered with the
98 ABQM and are competing or have competed in official *vaquejada* events.

99

100 **2.3 Genotyping**

101 Genomic DNA extraction from hair bulb samples was performed using an in-
102 house method. Initially, DNA was extracted from 20 hair bulbs by incubating them with
103 proteinase K (0.5 µL) at 56 °C for 1 hour in 90 µL of lysis buffer-K. Subsequently, 30
104 µL of protein precipitation buffer (5.7% ammonium acetate) was added, followed by
105 incubation at 25 °C for 2 min and centrifugation at 1900 G for 12 min. The resulting
106 supernatant (90 µL) was mixed with an equal volume of 100% isopropanol and subjected
107 to centrifugation, and the pellet obtained was washed with 70% ethanol. Afterward, the
108 tube was dried by incubating it at 37 °C for 10 minutes. The DNA was finally eluted with
109 30 µL of elution buffer (Tris-EDTA, pH 8.0) and incubated at 56 °C for 30 minutes.
110 Subsequently, the DNA samples were stored frozen at -20 °C until PCR procedures. PCR
111 amplification was conducted using previously described specific primers targeting
112 distinct regions associated with each variant in the MYH1 (MYHM) [13], SCN4A
113 (HyPP) [11], GYS1 (PSSM1), and RYR1 (MH) [12] genes. The PCR-amplified products
114 underwent purification using magnetic beads and subsequent direct Sanger sequencing
115 for all four variants. The resulting sequences and corresponding electropherograms were

116 analysed using Geneious® 10.0.9 (Biomatters Ltd.), enabling comparison with the
117 reference gene sequences for the assessment of genotypes across all four variants.

118 2.4 Data analysis

119 The inbreeding coefficient (F) was estimated utilizing Pedigraph® software (version
120 2.4). This calculation involved pedigree data from 81 *vaquejada* QH (42 males and 39
121 females), sourced from ABQM records spanning five ancestral generations. Allelic
122 frequency and standard error for each variant were estimated using the following
123 equations:

$$124 \text{ allele frequency} = \frac{\text{total number of mutant alleles} / \text{total number of animals}}{2} \quad \text{and}$$

$$125 \text{ standard error} = \sqrt{\frac{2 \text{ allele frequency} * (1 - \text{allele frequency})}{2 * \text{sample size}}}.$$

126

127 3. Results

128 Considering the 99% confidence interval, the minimum needed sample size,
129 regardless of the assessed variant, was determined to be 102 horses. At the time of
130 sampling, the 129 QH included in the present study were confirmed to be healthy. The
131 average inbreeding coefficient calculated within the group of 81 QH was 0.3% (smallest
132 nonzero: 0.0001; maximum: 0.5). Notably, among these 81 horses, 55 were identified as
133 inbred ($F = 2.9\%$).

134 All variants analysed were observed only in heterozygosity (Figure 1). The variant
135 *MYH1_E321G*, responsible for MYHM, was the most prevalent variant observed in 8%
136 (10/122) of QH, with an allele frequency and standard error of 0.04 ± 0.01 , followed by
137 *GYS1_c.926G>A* (PSSM1) with 2% (3/129) QH and 0.01 ± 0.01 . Finally, HyPP (*SCN4A*)
138 was observed in 0.8% (1/126) of animals, with an allele frequency and standard error of
139 0.004 ± 0.01 . The variant *RYR1* (MH) was not detected in the animals assessed in this
140 study.

141

142 4. Discussion

143 The overall inbreeding coefficient among the 81 *vaquejada* QH (0.3%) was notably
144 lower (i.e., there was no reduction in heterozygosity within the studied population),
145 especially when compared to other studies involving Quarter Horses from other
146 disciplines [16,17]. However, among the 55 inbred *vaquejada* QH, the inbreeding
147 coefficient was similar to those previously reported in Quarter Horses [16,17]. This

148 similarity indicates that inbreeding is prevalent in QH, underlining the critical importance
 149 of pedigree analysis to mitigate the inheritance of deleterious genetic traits.

150 The MYHM condition is attributed to the E321G variant found in the *MYH1* gene,
 151 which is responsible for encoding the myosin-heavy chain prevalent in fast-twitch muscle
 152 fibres of Type II-X. Within the MYHM disorder, two distinct muscular conditions—
 153 referred to as immune-mediated myositis (IMM) and nonexertional rhabdomyolysis—are
 154 categorized [9]. The MYHM allele frequency identified in vaquejada QH (0.04) was
 155 lower than that observed in Brazilian reining QH (0.11). However, this frequency was
 156 similar to the frequencies observed in barrel (0.05) and cutting (0.03) QH [13]. Similarly,
 157 the PSSM1 allele frequency (0.01) observed in the present study was similar to the
 158 frequencies observed in barrel (0.009) and cutting (0.01) and much smaller than those
 159 shown in reining (0.034) and halter (0.163) QH in Brazil [12]. These results reinforce the
 160 need and importance of genetic testing in animals with a history of myopathy;
 161 establishing an etiological diagnosis for these disorders will facilitate the implementation
 162 of appropriate treatment, nutritional management, and exercise regimens. This proactive
 163 approach may enhance the prognosis for affected animals during the clinical
 164 manifestation of these conditions. The utilization of popular sires within performance
 165 groups may inadvertently lead to the concentration of deleterious genetic traits or the co-
 166 occurrence of these traits alongside performance-enhancing traits.

167 The variant found in the *SCN4A* gene, associated with HyPP, induces a malfunction
 168 in the activation of the sodium channel. This malfunction leads to persistent
 169 depolarization in the cellular membrane of muscle fibres [6]. Horses affected by HyPP
 170 often exhibit well-developed musculature, possibly attributed to muscular contractions
 171 that result in hypertrophy [18]. In the USA, while the variant has been noted in western
 172 pleasure (0.01) and Barrel racing (0.006) QH lineages, the greatest allele frequency of
 173 HyPP was notably observed predominantly in halter QH (0.3) [19]. In Brazil, horses
 174 carrying the HyPP allele appear to be predominantly limited to the halter QH (AF = 0.15)
 175 [11]. Hence, it was surprising to detect a heterozygous horse for HyPP within the
 176 *vaquejada* QH. Previous studies analysed the morphology of *vaquejada* QH and showed
 177 that horses that have the function of unbalancing the calves by the tail have more muscular
 178 mass when compared with QH from barrel and long bow [20,21]. This suggests that
 179 focusing on stronger *vaquejada* horses, halter animals may have been used in crosses.

180 In addition, MH is a rare disorder observed in horses, affecting only approximately
 181 1% of American Quarter Horses and Paint Horses [18]. Corroborating a previous study

182 [13], our investigation also did not detect any carrier animals for the *RYR1* variant
183 responsible for MH.

184

185 **5. Conclusions**

186 This study represents an inaugural investigation into the variants associated with
187 muscular disorders among QH in Northeastern Brazil, particularly focusing on QH
188 *vaquejada* athletes. Based on the results obtained, we conclude that the main variants
189 associated with muscular disorders in these horses are MYHM and PSSM1, and the allele
190 frequencies of these variants were similar those previously observed in other disciplines
191 in Brazil. These findings suggest a potential influence of utilizing the same popular sires
192 to enhance performance in *vaquejada* QH and other disciplines.

193 Furthermore, understanding that *vaquejada* QH carry pathogenic alleles associated
194 with MYHM and PSSM1 variants is crucial. This knowledge is imperative for veterinary
195 practitioners to implement appropriate therapies for *vaquejada* QH affected by
196 myopathies. Despite identifying a horse heterozygous for HyPP, we can conclude that the
197 HyPP and MH variants are not significant factors in *vaquejada* QH. Ultimately, this study
198 signifies progress in understanding genetic diseases within *vaquejada* QH, and its
199 findings can aid in establishing preventive measures against these conditions.

200

201 **Conflict of interest statement**

202 No competing interests have been declared.

203

204 **Acknowledgements**

205 The authors acknowledge the funding agency FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa*
206 *do Estado de São Paulo*) for its financial support (2021/13539-1).

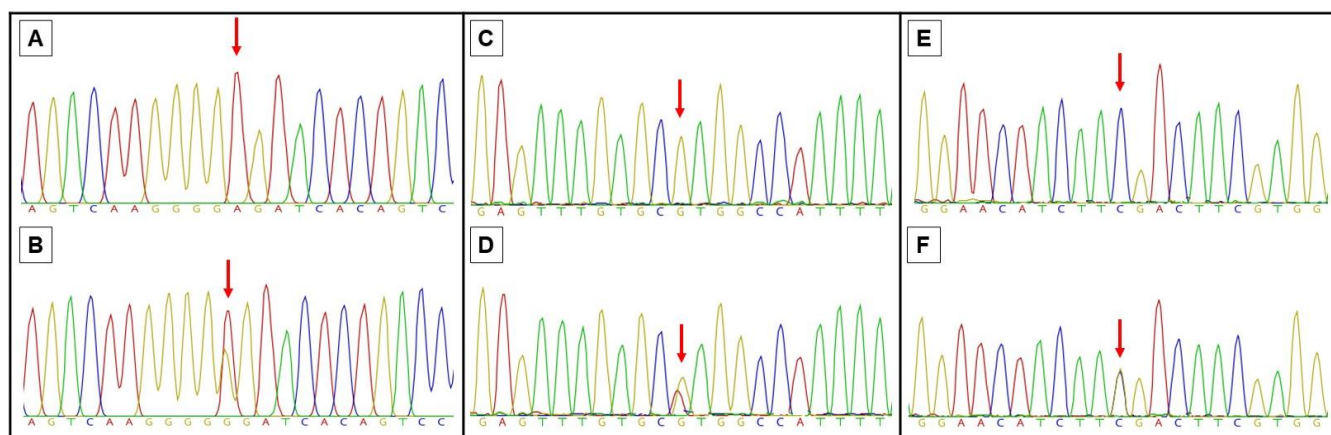
207 **References**

- 208 [1] ABQM (Associação brasileira de criadores de cavalos Quarto de Milha). Available
209 at: [https://abqm.com.br/noticias/vaquejada-movimenta-mais-de-r-800-milhoes-por-ano-](https://abqm.com.br/noticias/vaquejada-movimenta-mais-de-r-800-milhoes-por-ano-estima-abvaq)
210 [estima-abvaq](https://abqm.com.br/noticias/vaquejada-movimenta-mais-de-r-800-milhoes-por-ano-estima-abvaq). Accessed August: 30, 2023.
- 211 [2] Coelho CS, Sodre TDRP, Sousa LN, Siqueira RF, Manso Filho HC, Aragona F, Fazio
212 F. How Much Energy *Vaquejada* Horses Spend in a Field Simulation Test? *Animals*
213 2021;11:34–21.
- 214 [3] Sobré TDRP, Sousa LN, Silva CA, Santos J M, Sampaio MQ, Coni ROS, et al. Is
215 There an Ideal Rest Interval Between Races During *Vaquejada* in Which It Would Be
216 Possible to Associate Best Performance and Welfare? *J Equine Vet Sci* 2020; 91:103141.
- 217 [4] Aleman M, Scalco R, Malvick J, Grahn RA, True A, Bellone RR. Prevalence of
218 Genetic Mutations in Horses With Muscle Disease From Neuromuscular Disease
219 Laboratory. *J Equine Vet Sci* 2022;118:104–129.
- 220 [5] Valberg SJ. Muscle conditions affecting sport horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*
221 2018;34:253–76.
- 222 [6] Rudolph JA, Spier SJ, Byrns G, Rojas CV, Bernoco D, Hoffman EP. Periodic
223 paralysis in quarter horses: a sodium channel mutation disseminated by selective
224 breeding. *Nat Genet* 1992;2:144–7.
- 225 [7] Aleman M, Riehl J, Aldridge BM, Lecouteur RA, Stott JL, Pessah IN. Association of
226 a mutation in the ryanodine receptor 1 gene with equine malignant hyperthermia. *Muscle*
227 *Nerve* 2004;30:356–65.
- 228 [8] McCue ME, Valberg SJ, Miller MB, Wade C, DiMauro S, Akman HO, et al. Glycogen
229 synthase (GYS1) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenosis. *Genomics*
230 2008;91:458-66.
- 231 [9] Finno CJ, Gianino G, Perumbakkam S, Williams ZJ, Bordbari MH, Gardner KL, et
232 al. A missense mutation in MYH1 is associated with susceptibility to immune-mediated
233 myositis in Quarter Horses. *Skelet Muscle* 2018;8:7 .
- 234 [10] Gianino GM, Valberg SJ, Perumbakkam S, Henry ML, Gardner K, Penedo C, et al.
235 Prevalence of the E321G *MYH1* variant for immune-mediated myositis and nonexertional
236 rhabdomyolysis in performance subgroups of American Quarter Horses. *J Vet Intern Med*
237 2019;33:897-01.
- 238 [11] Delfiol DJ, Oliveira-Filho JP, Battazza A, Souza CP, Badial PR, Borges AS.
239 Prevalence of the hypercalemic periodic paralysis mutation in Quarter-Horses in Brazil.
240 *Cienc Rural* 2015;45(5):854–7.

- 241 [12] Delfiol DJ, Oliveira-Filho JP, Badial PR, Battazza A, Araujo-Junior JP, Borges AS.
 242 Estimation of the allele frequency of type 1 polysaccharide storage myopathy and
 243 malignant hyperthermia in Quarter Horses in Brazil. *J Equine Vet Sci* 2018;70:38–41.
- 244 [13] Albuquerque AL, Delfiol DJZ, Andrade DGA, Albertino LG, Sonne L, Borges AS,
 245 Valberg SJ, Finno CJ, Oliveira-Filho JP. Prevalence of the E321G MYH1 variant in
 246 Brazilian Quarter Horses. *Equine Vet J* 2021;00:1–6.
- 247 [14] ABQM (Associação brasileira de criadores de cavalos Quarto de Milha). Available
 248 at:[https://www.abqm.com.br/noticias/abqm-esclarece-duvidas-sobre-as-principais](https://www.abqm.com.br/noticias/abqm-esclarece-duvidas-sobre-as-principais-mudancas-no-regulamento-do-srgcqmqm)
 249 [mudancas-no-regulamento-do-srgcqmqm](https://www.abqm.com.br/noticias/abqm-esclarece-duvidas-sobre-as-principais-mudancas-no-regulamento-do-srgcqmqm). Accessed August: 30, 2023.
- 250 [15] MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Revisão do Estudo
 251 do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Available at:
 252 [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo)
 253 [tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo)
 254 [estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo). Accessed August: 30, 2023.
- 255 [16] Petersen JL, Mickelson JR, Cleary KD, McCue ME. The american quarter horse:
 256 population structure and relationship to the thoroughbred. *J Hered* 2014;105: 148-62.
- 257 [17] Faria RAS, Maiorano AM, Bernardes PA, Pereira GL, Silva MGB, Curi RA, et al.
 258 Assessment of pedigree information in the Quarter Horse: population, breeding and
 259 genetic diversity. *Livest Sci* 2018;214:135-41.
- 260 [18] Valberg SJ. Genetics of Equine Muscle Disease. *Vet Clin Equine* 2020;36:353–378.
- 261 [19] Tryon RC, Penedo MCT, McCue ME, Valberg SJ, Mickelson JR, Famula TR, et al.
 262 Evaluation of allele frequencies of inherited disease genes in subgroups of American
 263 Quarter Horses. *J Am Vet Med Assoc* 2009;234:120–5.
- 264 [20] Donofre AC, Puoli-Filho JNP, Ferreira IEP, Mota MDS de, Chiquitelli Neto M.
 265 Balance of Quarter Horses participating in the barrel racing modality by using body
 266 proportions. *Cienc Rural* 2014;44:327-32.
- 267 [21] Rezende MPG, Abreu UGP, Souza JC, Santos AS, Ramires GG, Sitorski LG. Body
 268 morphology of purebred and crossbred Quarter horses used in Lasso competitions in Mato
 269 Grosso do Sul. *Arch. Zootec* 2015;64:183-6.

270 **Figure Legends**

271 **Figure 1.** Partial electropherograms of wild-type (A, C, and E) and heterozygous (B, D, and F)
272 animals. **Red arrows:** point of the variant. **A and B:** MYHM variant; wild type (A/A) and
273 heterozygous (A/G); **C and D:** PSSM1 variant; wild type (G/G) and heterozygous (G/A); **E and**
274 **F:** HyPP variant; wild type (C/C) and heterozygous (C/G). Geneious® 10.0.9.

**Fig. 1**

CAPÍTULO III

Considerações Finais

Sendo assim, diante dos resultados, concluímos que as variantes responsáveis por MYHM, PSSM1 e HYPP estão presentes nos equinos QM de vaquejada do Nordeste Brasileiro. Tratando-se de mutações autossômicas dominantes, é ainda maior a importância do diagnóstico precoce, afim de identificar animais heterozigotos e evitar a reprodução, principalmente por serem enfermidades musculares que podem causar grandes perdas na performance atlética desses animais. Além disso, o estudo pode orientar a ação de Médicos Veterinários que atuam diretamente com estes animais, pois muitos desconhecem a existência destas enfermidades no QM de vaquejada.

Normas para submissão

Revista “Journal of Equine Veterinary Science”

Guide for Authors



Download Guide for Authors in PDF

Aims and scope

INTRODUCTION

- Types of article
- Submission checklist

BEFORE YOU BEGIN

- Ethics in publishing
- Animal Welfare
- Conflict of Interest
- Declaration of generative AI in scientific writing
- Submission declaration and verification
- Preprint posting on SSRN
- Use of inclusive language
- Reporting sex- and gender-based analyses
- Author contributions
- Authorship

- Changes to authorship
- Copyright
- Role of the funding source
- Open access
- Submission
- Referees

PREPARATION

- Queries
- Peer review
- Use of word processing software
- Article structure
- Essential title page information
- Highlights
- Abstract

- Keywords
- Nomenclature
- Formulae
- Artwork
- Tables
- References
- Data visualization
- Supplementary material
- Research data
- Research Elements
- AFTER ACCEPTANCE**
- Online proof correction
- Offprints
- AUTHOR INQUIRIES**



Introduction

Journal of Equine Veterinary Science (JEVS) is an international publication designed for the practicing equine veterinarian, equine researcher, and other equine health care specialists. Published monthly, each issue of *JEVS* includes original research, reviews, case reports, short communications, and clinical techniques from leaders in the equine veterinary field, covering such topics as laminitis, reproduction, infectious disease, parasitology, behavior, podology, internal medicine, surgery and nutrition. *JEVS* is also an official publication of the Equine Science Society.

Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Case Reports
4. Short Communications
5. Clinical Techniques

Original Research: Research or extensive clinical reports containing significant new findings. The material presented should be original and not have been published elsewhere, except in a preliminary form. Papers will be reviewed by referees familiar with the subject matter of the paper. Revisions are likely to be expected.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal, which are of active current interest. Papers need not contain original work or ideas. They will be reviewed for completeness, accuracy, style and suitability of content by referees familiar with the subject and the Editor-in-Chief. Revisions may be requested

Case Reports are practitioner-oriented reports meant to communicate the facts of an interesting case or series of cases. Papers will be peer reviewed. Revisions are likely to be expected. The major concerns of the critique will be accuracy of diagnosis and relevance to equine practice.

Short Communications are intended to provide quick publication of highly relevant and interesting information. Manuscripts should contain original data and be limited to 2000 words. The number of tables and figures are limited to two each. A limited number of references should be included. Manuscripts will be peer reviewed by two reviewers and the Editor.

Clinical Techniques should describe a procedure or technique that must include 1) an overview and a description of the procedure; 2) a detailed series of images and descriptive text describing each step of the procedure; 3) a detailed description of the instruments and other materials needed to perform the procedure as well as trade name, manufacturer's name and address; 4) a summary or conclusion; and 5) references. Additional information acceptable for this section would include topics of current interest to our colleagues whether it is a technique or subject that can be used in the clinical situation. "New drug regimens for use in the horse" is one example of such a clinical topic that has direct application to the equine.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Please ensure you create line numbers (continuous) and page numbers (lower

right) in your word processor.

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all tables and figures are "stand alone" with enough detail to be understood without reference to the body of the manuscript and acronyms are spelled out on first appearance in the figure legends and table titles/legends
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Ensure you have added your ethical statement into the materials and methods section of your manuscript. This will include your institutional ethics/animal care and use committee approval number and the date of approval. In the case where equids have been seen as part of veterinary treatment, a statement confirming that owners provided informed consent will be required.
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Animal Welfare

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from the following

URL: http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm

. An animal welfare statement must be stated at an appropriate point in the article. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Journal of Equine Veterinary Science*.

Conflict of Interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#)

Declaration of generative AI in scientific writing

The below guidance only refers to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process.

Where authors use generative artificial intelligence (AI) and AI-assisted technologies in the writing process, authors should only use these technologies to improve readability and language. Applying the technology should be done with human oversight and control, and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. AI and AI-assisted technologies should not be listed as an author or co-author, or be cited as an author. Authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans, as outlined in Elsevier's [AI policy for authors](#).

Authors should disclose in their manuscript the use of AI and AI-assisted technologies in the writing process by following the instructions below. A statement will appear in the published work. Please note that authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.

Disclosure instructions

Authors must disclose the use of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process by adding a statement at the end of their manuscript in the core manuscript file, before the References list. The statement should be placed in a new section entitled 'Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process'.

Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

This declaration does not apply to the use of basic tools for checking grammar, spelling, references etc. If there is nothing to disclose, there is no need to add a statement.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of [Open Science](#), this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server [SSRN](#) once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to [SSRN](#), please consult the [SSRN Terms of Use](#) and [FAQs](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or

health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER guidelines checklist](#). These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the

SAGER guidelines, the [resources on this page](#) offer further insight around sex and gender in research studies.

Author contributions

For transparency, we require corresponding authors to provide co-author contributions to the manuscript using the relevant CRediT roles. The [CRediT taxonomy](#) includes 14 different roles describing each contributor's specific contribution to the scholarly output. The roles are: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. Note that not all roles may apply to every manuscript, and authors may have contributed through multiple roles. [More details and an example](#).

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your

manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these

free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [Language Editing service](#) available from Elsevier's Language Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/JEVS/default.aspx>.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliation (department, institution, city and country) and email addresses of up to 5 potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject but have no close connection with any of the authors. In addition, Referees should be from institutions other than (and preferably countries other than) those of any of the Authors. You may also suggest reviewers you do not want to review your manuscript, but please state your reasons for doing so. The Editors retain the right to choose reviewers as deemed appropriate. All submissions will be reviewed by at least two anonymous reviewers to evaluate them for originality, clear statement of a hypothesis, appropriate experimental design, completeness of methods, a logical and comprehensive discussion, and conclusions that are supported by data.



Preparation

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will

be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An

abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature

- Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
- All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
- All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
- For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

Formulae

- Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
- For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
- Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
- The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
- In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .
- Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .
- The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature

may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG);

these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your

manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Papa FO, Melo CM, Monteiro GA, Papa PM, Guasti PN, Maziero RRD, et al. Equine perineal and vulvar conformation correction using a modification of Pouret's technique. J Equine Vet Sci 2014;34:459–64.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York:

E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Reference to a dataset:

[4] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in a [Research Elements journal](#).

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a manuscript to one of the Research Elements journals.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).



After Acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.