

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**VARIABILIDADE NA EXPRESSÃO DA REATIVIDADE DE
POTROS BRASILEIRO DE HIPISMO**

**Bruno Nogueira de Oliveira Lima
Zootecnista**

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**VARIABILIDADE NA EXPRESSÃO DA REATIVIDADE DE
POTROS BRASILEIRO DE HIPISMO**

Bruno Nogueira de Oliveira Lima

Orientador: Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa

Co-Orientadora: Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Genética e Melhoramento
Animal.**

2017

L732v Lima, Bruno Nogueira de Oliveira
Variabilidade na expressão da reatividade de potros brasileiro de hipismo não associada à polimorfismo do gene DBH / Bruno Nogueira de Oliveira Lima. -- Jaboticabal, 2017
iii, 38 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa
Banca examinadora: Kátia de Oliveira, José Correa de Lacerda Neto
Bibliografia

1. Cavalos. 2. Reatividade. 3. Variabilidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: VARIABILIDADE NA EXPRESSÃO DA REATIVIDADE DE POTROS
BRASILEIRO DE HIPISMO

AUTOR: BRUNO NOGUEIRA DE OLIVEIRA LIMA

ORIENTADOR: MATEUS JOSÉ RODRIGUES PARANHOS DA COSTA

COORIENTADORA: NEDENIA BONVINO STAFUZZA

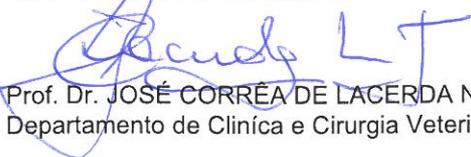
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em GENÉTICA E
MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MATEUS JOSÉ RODRIGUES PARANHOS DA COSTA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. KATIA DE OLIVEIRA
Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - Unesp



Prof. Dr. JOSÉ CORRÊA DE LACERDA NETO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 22 de maio de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Bruno Nogueira de Oliveira Lima - nasceu em 27 de agosto de 1976, na cidade do Rio de Janeiro - RJ, filho de Luiz Alberto de Mendonça Lima e Elisa Maria Nogueira Lima. Em Julho de 1999 obteve o título de Zootecnista pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) e iniciou sua carreira como treinador de cavalos de hipismo na região de Ribeirão Preto. Após 15 anos atuando no meio hípico, em Março de 2015 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal - SP, sob orientação do Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa e co-orientação da Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa, pelo apoio e compreensão nas horas mais difíceis. À minha co-orientadora, Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza por toda a paciência e ajuda no laboratório.

À pesquisadora Anita Schmidek por toda a ajuda durante a coleta de dados e à Maria Camila Ceballos pela cooperação na análise de dados.

À APTA regional de Colina, à coudelaria do Rincão e ao Haras Itapuã por disponibilizar seus animais e instalações para a realização desse estudo.

Ao Prof. Dr. Humberto Tonhati, à Dra. Luciana e à todos do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, UNESP.

Ao meu pai, Luiz Alberto, e minha mãe, Elisa Maria por sempre me apoiarem, mesmo quando discordam das minhas atitudes. À minha esposa, Anatiara Dermani, e a minha filha, Caroline, por existirem.

A CAPES, pela bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
1.1. Os equinos no Brasil e no mundo.....	1
1.2. O Cavalo "warmblood" e a raça Brasileiro de Hipismo.....	3
1.3. Temperamento nos equinos.....	5
1.4. Temperamento no melhoramento genético dos equinos.....	6
1.5. Associação entre temperamento e marcadores genéticos.....	8
1.6. Objetivos.....	11
2. Material e métodos	11
2.1. Animais e locais de estudo.....	11
2.2. Análise Comportamental.....	12
2.3. Análise laboratorial do gene DBH.....	16
2.4. Análise dos dados.....	17
3. Resultados e discussão	18
3.1. Análise dos fatores.....	18
3.2. Análise da distribuição populacional do fator 1.....	22
3.3. Análise da variabilidade do polimorfismo do gene DBH.....	28
4. Conclusões.....	30
5. Referências.....	31

**VARIABILIDADE NA EXPRESSÃO DA REATIVIDADE DE POTROS
BRASILEIRO DE HIPISMO NÃO ASSOCIADA À POLIMORFISMO DO GENE
DBH**

RESUMO - Em todos os esportes equestres é comum que os animais sejam testados com grande variação de obstáculos, percursos e ambientes. Essas dificuldades impostas nas provas equestres justificam o foco em um dos aspectos mais importantes do temperamento dos cavalos: sua reatividade ou comportamento de fuga ("flightness"). A reatividade dos potros pode ser caracterizada pela aproximação ou fuga de determinado estímulo. Este estudo teve como objetivo verificar a existência da variabilidade na expressão do comportamento de um grupo de potros Brasileiro de Hipismo (BH) frente à novo objeto e se existe alguma associação entre a reatividade dos animais durante o teste do novo objeto e a presença do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP - Single Nucleotide Polymorphism) A758T do gene DBH. O teste do novo objeto (feito com a utilização de um guarda-chuva aberto) foi realizado em 260 potros Brasileiro de Hipismo (BH) sem nenhum treinamento montado. A avaliação da reatividade e rapidez de habituação foi feita por avaliação qualitativa do comportamento (QBA - *Qualitative Behavior Analysis*) durante o teste de novo objeto. Foi possível observar grande variabilidade fenotípica entre os potros, sendo que os animais foram divididos em um grupo com altos valores para as variáveis RELAXADO, FOCADO, CONFIANTE e POSITIVAMENTE CURIOSO e outro grupo de animais com altos valores para PRECAVIDO, AGITADO, CONFUSO e DESESPERADO. Também foi observado que os criatórios diferiram entre si quanto à adoção de seleção direcional ou não para a reatividade dos animais. Apesar disso, a presença de animais que podem ser caracterizados como "patologicamente ansiosos", evidencia a necessidade de maior atenção por parte dos criatórios nacionais na seleção de animais com menor reatividade. O nosso estudo evidenciou também que a SNP A758T no gene DBH não estava presente no subgrupo de 20 animais genotipados dentro da população estudada. Esse subgrupo de 20 animais genotipados era não aparentado e possuía fenótipo representativo da população, portanto, desestimula pesquisas futuras com a SNP A758T na raça BH.

Palavras-chave: cavalos, reatividade, variabilidade

VARIABILITY IN REACTIVITY EXPRESSION OF BRAZILIAN SPORT HORSES AND ITS ASSOCIATION WITH DBH GENE POLYMORPHISM

Abstract - In all the equestrian sports it is common that the animals are tested with a great variation of obstacles, courses and environments. These difficulties imposed in the equestrian sports justify the focus in one of the aspects of a horse's temperament: his reactivity or flight behavior ("flightiness"). The horse's reactivity can be characterized by his approach or escape of determined stimulus. This study aimed to verify the existence of behavior variability in Brazilian Sport Horse fillies and colts and if there is any association between that behavior and the presence of the DBH SNP A758T. In order to accomplish this, we tested 260 Brazilian Sport Horse fillies and colts, without any mounted training, in a novel object test using an umbrella. The horse's reactivity and habituation speed was analyzed through a QBA- Qualitative Behavior Analysis during the novel object test. It was possible to observe a great phenotypic variability between the animals and divide them in a group with high values for the variables RELAXED, FOCUSED, CONFIDENT and POSITIVELY CURIOUS and another group of animals with high values for CAUTIOUS, AGITATED, CONFUSED and DESPAIRED. We also observed that the breeders differed with respect to the adoption of a directional selection or not for the animals' reactivity. In spite of this, the presence of animals that can be characterized as "pathologically anxious", shows the need for a greater attention on the part of national breeders in the selection of animals with less reactivity. Moreover, our study also showed that SNP A758T in the DBH gene was not present in a subgroup of 20 animals within the study population. This subgroup of 20 genotyped animals were unrelated and had a phenotype representative of the population, therefore discourages future research with SNP A758T in Brazilian Sport Horses.

Keywords: horses, reactivity, variability

1. Introdução

1.1 Os equinos no Brasil e no mundo

O rebanho equino mundial é de quase 59 milhões de animais, número este que se manteve relativamente estável nas duas últimas décadas. O continente americano concentra mais de 50% deste total (Figura 1), sendo que desde do ano de 2000 o rebanho equino dos Estados Unidos da América praticamente dobrou o tamanho e atualmente é o país com o maior número de animais (Figura 2) (FAO, 2016). Este crescimento se deu, muito provavelmente, em função da mudança de uso do cavalo, sendo observada a substituição da sua utilização como animal de trabalho para funções ligadas ao lazer e esporte. Dados do continente europeu, no qual muitos países possuem rebanhos expressivos de equinos, sustentam essa constatação. Nesses países é possível observar correlação positiva entre os níveis de consumo e educacional das famílias e o número de cavalos per capita. Além disso, há correlação negativa entre a taxa de desempregados e o número de cavalos per capita (LILJENSTOLPE, 2009).

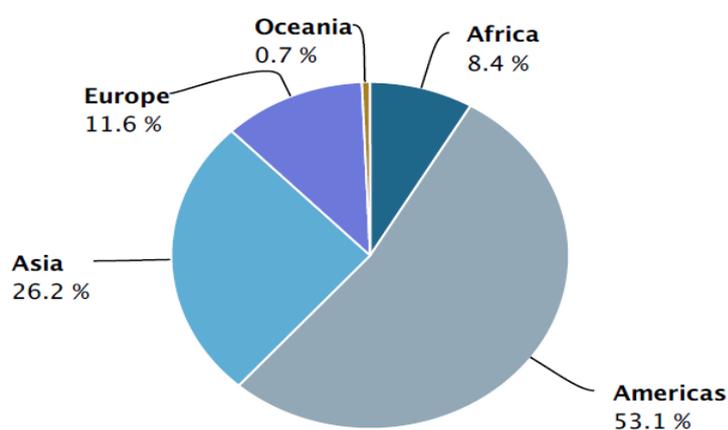
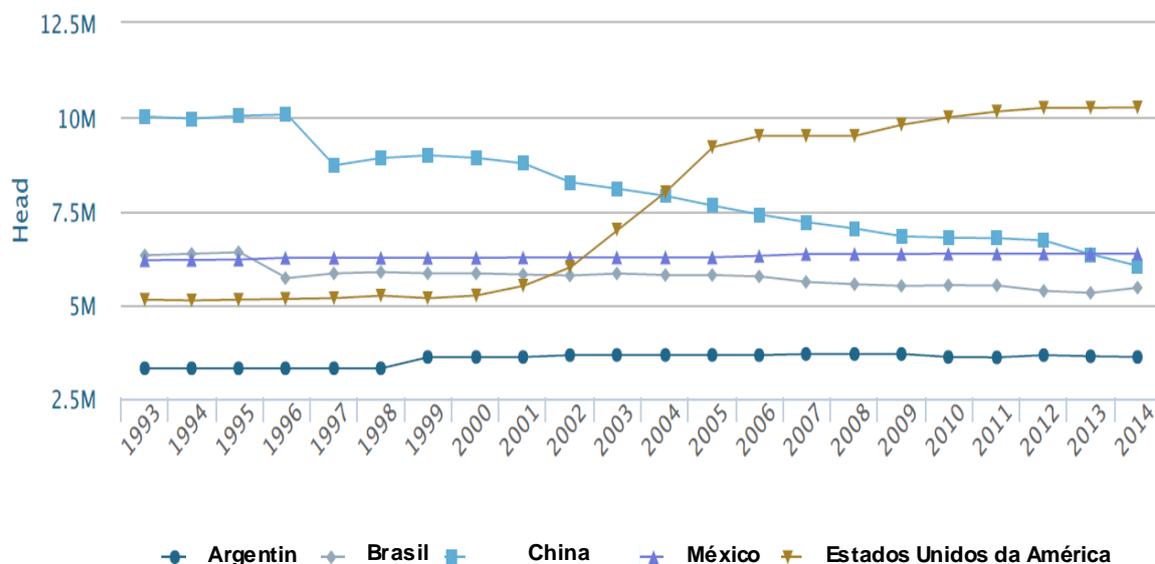


Figura 1 – Distribuição do rebanho mundial de equinos nos cinco continentes (FAO, 2016).



M=milhões; K=milhares

Figura 2 - Evolução do rebanho equino de 1993 a 2014 nos cinco países com o maior número de animais (FAO, 2016).

A criação de equinos no mundo também é responsável por significativa movimentação financeira e por milhares de empregos. Somente no estado americano de Kentucky os cavalos movimentam U\$ 3 bilhões anualmente e empregam 13.000 trabalhadores (UK & KHC, 2013). Essa situação se repete em muitos países europeus sendo que, no Reino Unido, por exemplo, são estimados 200.000 empregos diretos e indiretos no setor e mercado consumidor de 11 milhões de pessoas (DEFRA, 2004).

No Brasil o agronegócio do cavalo movimenta anualmente R\$ 7,5 bilhões e é estimado que 640.000 pessoas estejam envolvidas com a atividade (LIMA et al., 2006). Segundo esses autores o efetivo total da tropa no país é de aproximadamente 5.800.000 animais, sendo que cinco milhões de equinos são utilizados na lida do gado ou no apoio às outras atividades agropecuárias e cerca de 800 mil cavalos são usados nas atividades de esporte e lazer. Esses autores afirmam também que apesar de pequeno decréscimo no número de animais nas últimas duas décadas, a importância do cavalo como animal de esporte e lazer tem crescido e o número de eventos organizados pela Federação Paulista de Hipismo (FPH), por exemplo, cresceu 315% entre 2001 e 2006.

1.2 O cavalo "warmblood" e raça Brasileiro de Hipismo (BH)

O termo "warmblood" foi inicialmente utilizado para cavalos fruto do cruzamento entre pesados cavalos de tração ("coldbloods") e cavalos leves ("hotbloods") das raças Árabes e Puro Sangue Inglês (PSI). No entanto, atualmente esse termo é empregado para diversas raças de cavalos utilizadas nos esportes hípicas. O primeiro livro de registro genealógico ("Stud book") de raça "warmblood" é do cavalo Trakehner e data de 1732 (TRAKEHNERS, 2016).

Desde a idade média países da Europa vêm desenvolvendo algum tipo de seleção para a reprodução de cavalos. Até a segunda guerra mundial havia muita influência estatal neste processo e os objetivos eram primordialmente militares. A partir das décadas de 1960 e 1970, com a diminuição do uso militar do cavalo e o crescimento dos esportes equestres, houve maior interesse na seleção de "warmbloods" por parte de investidores privados (FN, 2014).

Atualmente as raças de cavalo do tipo "warmblood" de diversos países europeus possuem sofisticados programas de melhoramento genético coordenadas por suas respectivas associações de criadores ou por suas federações equestres nacionais, que por sua vez trabalham sob a tutela da WBFSH (World Breeding for Sport Horses). A WBFSH é a entidade internacional responsável pelo reconhecimento das associações de cavalos de esportes do mundo todo e que representa essas associações junto a FEI (Fédération Équestre Internationale) (WBFSH, 2016). O Brasil possui a ABCCBH (Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Brasileiro de Hipismo) registrada junto a WBFSH, porém ainda não possui programa de melhoramento genético bem estruturado. Contudo, já existem alguns esforços da ABCCBH como o mapa genético de garanhões, os formulários de campo para avaliação de matrizes e fontes estatísticas da raça (ABCCBH, 2016).

A raça BH teve seu início com a fundação ABCCH em 1977, cujo objetivo foi criar e desenvolver raça de cavalos com aptidão para os esportes hípicas (modalidades de salto, adestramento e concurso completo de equitação

ou CCE) (ABCCH, 2016). Atualmente, o cavalo BH tem sido bastante usado também no policiamento, sendo que tanto o Exército Brasileiro como a Polícia do Estado de São Paulo fazem uso quase que exclusivo desta raça para suas atividades.

Na formação da raça BH foram utilizados cruzamentos entre garanhões importados ou nacionais, registrados em associações das chamadas raças formadoras e éguas base (SBBCH, 1999). As éguas base são fêmeas, com ou sem genealogia conhecida, que possuem características morfológicas e funcionais para produzir animais dentro do padrão racial do cavalo BH. No entanto o livro de éguas-base se encontra fechado por tempo indeterminado. São consideradas como raças formadoras do cavalo BH as seguintes raças: Árabe, Anglo Árabe, Andaluz, Anglo European, American Saddlebred, American Warmblood, Bavarian, Bayern, Hannoveriana, Hessen, Holsteiner, Mecklenburg, Anglo Normando, Oldenburguer, Puro Sangue Ingles, Rheiland, Sachsen-Anhalt, Sela Argentina, Sela Belga, Sela Dinamarquesa, Sela Francesa, Sela Holandesa, Sela Irlandesa, Sela Italiana, Sela Luxemburguase, Sela Mexicana, Sela Norueguesa, Sela Polonesa, Sela Suiça, Sela Sueca, Sela Uruguaia, Trackener, Westfalen, Wurttemberg, Zangersheide, Zwebrucken e Friesian (SBBCH, 1999). Dentre essas raças formadoras as principais raças de garanhões foram PSI (20,9%), Hanoverana (16,1%), Westfalen (10,5%), Holsteiner (9,6%) e Trakehner (8,2%), além de machos da própria raça BH com contribuição de 8,7%. As principais raças de fêmeas foram éguas base (42,8%), PSI (10,8%) e éguas da própria raça BH (36,2%) (DIAS et al., 2000).

O Cavalo BH é o produto resultante de cruzamentos entre garanhões aprovados pelo Stud Book Brasileiro do Cavalo de Hipismo, com éguas de raça formadora; entre garanhões aprovados pelo Stud Book Brasileiro do Cavalo de Hipismo, com égua inscritas no Stud Book Brasileiro do Cavalo de Hipismo na categoria especial de “éguas bases” e entre garanhões aprovados pelo Stud Book Brasileiro do Cavalo de Hipismo com éguas BH. Além disso, o SBBCH poderá emitir parecer de importação para machos acima de três anos de uma das raças formadoras e utilizar esses garanhões em cruzamentos, desde que sejam aprovados como reprodutor em seu Stud Book de origem (SBBCH,

1999). Atualmente a ABCCH conta com aproximadamente 330 associados e mais de 20 mil animais registrados, entre BHs e animais das raças formadoras (ABCCH, 2016). O cavalo BH participou da conquista das medalhas de bronze da Equipe Brasileira de Hipismo nas Olimpíadas de Atlanta, em 1996 e Sydney em 2000, além das 3 medalhas de ouro e 1 medalha de prata por equipe em Jogos Pan Americanos.

1.3. Temperamento nos equinos

Temperamento pode ser definido como um conjunto de tendências comportamentais de um indivíduo, que permanecem relativamente estáveis ao longo do tempo e em diferentes situações (LLOYD et al., 2007; BORSTEL et al., 2011). O temperamento pode ser caracterizado por diferentes componentes, tais como a atividade (caracterizado pela intensidade, vigor e ritmo dos movimentos), a emotividade (caracterizado pelas emoções negativas e positivas), a sociabilidade (caracterizado pela preferência ou ausência desta do contato com outros indivíduos) e a reatividade (caracterizada pela aproximação ou fuga de determinado estímulo) (GOLDSMITH et al., 1987).

Dentre os componentes do temperamento do cavalo, a reatividade ou comportamento de fuga ("flightness" ou "easy to spook") tem-se apresentado como uma das características mais importantes e estáveis (BORSTEL et al., 2011). Por outro lado, a habituação frente a novos objetos também desperta interesse, pois há evidências de que o cavalo diminui as respostas evasivas somente ao objeto para o qual foi treinado e não transfere essa diminuição de reatividade para outros objetos no mesmo contexto (LE INER & FENDT, 2011). Além disso, em estudos com pessoas diretamente envolvidas com o manejo dos equinos, foi verificado que o bom temperamento dos animais é essencial para desenvolvimento de suas atividades rotineiras (GRAF et al., 2013). Isto é facilmente explicado pelo fato de que em todos os esportes equestres é comum que os animais sejam testados com grande variação de obstáculos, percursos e ambientes. Dito isso, pode ser assumido que a baixa reatividade e a rápida habituação a objetos desconhecidos são qualidades a serem selecionadas em animais de esporte, lazer ou trabalho.

1.4. Temperamento no melhoramento genético dos equinos

A estrutura dos programas de melhoramento genético dos países europeus é baseada em estatísticas do desempenho competitivo dos cavalos e desempenho dos cavalos em testes de cavalos novos, onde ocorrem avaliação da conformação, saúde e temperamento dos animais (STOCK, 2013).

A avaliação do temperamento em testes de cavalos novos tem o benefício de diminuir o intervalo de gerações para a seleção desta característica. O intervalo de gerações pode ser definido como a média da idade dos pais quando sua progênie nasce. Além disso, o treinamento de hipismo tem como um dos seus principais objetivos habituar os animais aos diferentes testes à que é submetido nas provas hípicas. À medida que uma população de potros é treinada, a tendência é que sua reatividade diminua e o efeito do treinamento sobre seu fenótipo aumente. No entanto, dependendo das técnicas de treinamento utilizadas, os resultados de diminuição da reatividade obtidos podem variar consideravelmente. Podemos citar como exemplo disso, estudos que verificaram que técnicas que utilizam métodos graduais para acostumar os cavalos à objetos novos conseguem maior diminuição de reatividade do que técnicas que introduzem os cavalos à objetos novos de forma mais repentina (CHRISTENSEN; RUNDGRNEN; OLSSON, 2006). Assim sendo, a avaliação da reatividade em cavalos novos realizada nos programas de melhoramento genético dos países europeus nos parece o método mais indicado, caso contrário, o risco de avaliar a eficácia do treinamento à que os animais foram submetidos, ao invés de avaliarmos o mérito genético desses animais seria muito grande.

A reatividade dos animais, assim como a maior parte das características de interesse zootécnico, possui distribuição contínua. As características de distribuição contínua, podem sofrer três processos distintos de seleção (DIMECH, 2011); o primeiro processo é a seleção estabilizadora onde os valores intermediários da característica são favorecidos e a população tende a manter aquela característica estável ao longo do tempo (Figura 3); o segundo processo é a seleção direcional onde um dos valores extremos é favorecido e a população tende a mudar aquela característica neste sentido (Figura 4) e o terceiro processo é a seleção disruptiva onde ambos os extremos são

favorecidos e ocorre aumento da diversidade genética dentro da população (Figura 5).

Não foram identificados estudos na literatura que abordassem a distribuição populacional para o temperamento de potros. Sabe-se que na Europa os testes de cavalos novos procuram favorecer animais menos reativos e mais calmos, no entanto, essa é apenas uma das características levadas em consideração nos programas de melhoramento genético. É óbvio que características ligadas diretamente ao desempenho, como por exemplo, a qualidade dos andamentos ou do salto sob obstáculos, tenham mais peso na seleção dos animais. No Brasil, como atualmente não ocorre avaliação de temperamento dos animais para aprovação de matrizes ou garanhões do BH a falta de informações é ainda maior.

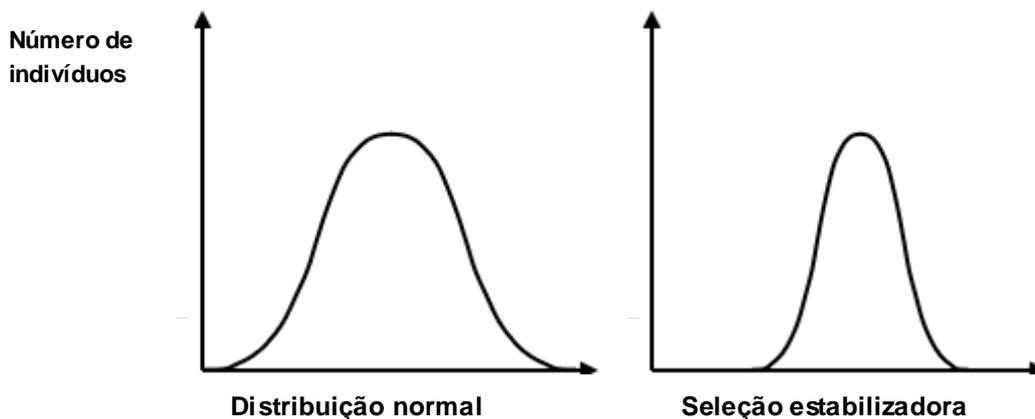


Figura 3 - Exemplo de seleção estabilizadora sob a distribuição normal (adaptado de DIMECH, 2011)



Figura 4 - Exemplo de seleção direcional sob a distribuição normal (adaptado de DIMECH, 2011)



Figura 5 - Exemplo de seleção disruptiva sob a distribuição normal (adaptado de DIMECH, 2011)

1.5. Associação entre temperamento e marcadores moleculares

As características com variação fenotípica de caráter contínuo são determinadas por muitos genes. O termo "Quantitative Trait Loci - QTL" se refere a regiões do DNA responsáveis por determinada característica de interesse. Uma das formas de identificação dos QTL é através de "Genome Wide Association Studies - GWAS", que são estudos em que ocorre varredura completa do genoma através do uso de painéis de SNPs ("Single Nucleotide Polymorphisms"). SNP ou polimorfismos de nucleotídeo único é uma variação

na sequência de DNA, presente em ao menos 1% da população, que afeta somente um nucleotídeo, cuja alteração pode ser a substituição, inserção ou deleção de um nucleotídeo. Os estudos de GWAS permitem estimar a associação entre os SNPs contidos no painel e determinado fenótipo. Recentemente foi realizado o primeiro GWAS para temperamento de cavalos e foi verificado a existência de alguns QTL (STAIGER; ALBRIGHT; BROOKS, 2016). Nesse estudo, foram encontrados diferentes QTL para animais classificados em mais ou menos ansiosos, com maior ou menor facilidade de manejo (reunião de características como docilidade, reatividade e submissão ao treinamento) e mais ou menos agressivos em relação a outros animais.

No entanto, os estudos de GWAS não são capazes de identificar os genes responsáveis pela expressão fenotípica. Após a identificação dos QTL é necessário então que se conduzam novos estudos para identificar os genes e os polimorfismos cuja função biológica possua relação de causa com o fenótipo. A localização do gene candidato é importante pois a proximidade de regiões no genoma está intimamente relacionada ao conceito de desequilíbrio de ligação gênica, que é a associação não aleatória de alelos em dois ou mais *loci*. Quanto mais próximos são dois *loci* maior é seu desequilíbrio de ligação, pois menor será sua taxa de recombinação genética. A recombinação genética, ou "crossing over", é a troca de genes entre dois cromossomos e que juntamente com a mutação, são os grandes responsáveis pela variabilidade genética nas populações. Assim sendo, se o gene candidato está localizado dentro do QTL ou próximo a ele, a possibilidade de ele estar influenciando determinada característica fenotípica é aumentada.

Como mencionado, o primeiro GWAS para temperamento de equinos só foi realizado recentemente (STAIGER; ALBRIGHT; BROOKS, 2016) e até então os estudos de genes candidatos relacionados ao tema foram baseados exclusivamente na função biológica dos genes. Assim, foram realizados alguns estudos de genes candidatos para temperamento dos cavalos em genes envolvidos com o metabolismo da serotonina e da dopamina, ambos neurotransmissores.

O gene *SLC6A4* ("solute carrier family 6 member 4"), que codifica proteína transportadora de serotonina, , apesar de associado à "evitação de

perigo" ("harm avoidance") em humanos, não foi associado a "ansiedade" em cavalos PSI (MOMOZAWA et al., 2006). Esse estudo comparou o comportamento de 67 cavalos avaliados através de questionários, aplicados aos seus respectivos tratadores e determinou sua "ansiedade" através de características como excitabilidade, timidez, vigilância e inconsistência emocional. O gene *SLC6A4* foi estudado também em cavalos da raça Mangalarga, no entanto, suas frequências alélica e genotípica desestimularam pesquisas de associação tanto para o gene *SLC6A4*, como para outro receptor de serotonina, o gene *HTR1A* ("5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A, G protein-coupled") (ARNEIRO, 2011).

O gene *DRD4* ("dopamine receptor D4"), que codifica proteína receptora da dopamina, já foi amplamente estudado na espécie humana e existem fortes evidências de associação entre polimorfismos no gene *DRD4* e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (BECKER et al., 2010, YILMAZ et al., 2012). Já foi verificado também associação de polimorfismos do *DRD4* com diversos outros transtornos psiquiátricos (AGUIRRE et al., 2007, PTÁCEK; KUZELOVA; STEFANO, 2011). Na espécie equina, evidências da associação da SNP G292A do gene *DRD4* com "vigilância e curiosidade" do cavalo foram encontradas no Japão (MOMOZAWA et al., 2005). Esse estudo utilizou 136 animais já domados, sendo o comportamento avaliado via questionário com pessoas próximas aos animais. Este mesmo SNP do gene *DRD4* foi estudada em diferentes raças de cavalos e as frequências dos alelos em cada raça foi significativamente diferente, o que pode explicar parte do temperamento característico de cada uma dessas raças (HORI et al., 2013). Existem também evidências de que este mesmo SNP do gene *DRD4* está relacionado com a frequência de comportamentos estereotipados ligados a "frustração" de cavalos mantidos em cocheiras, tais como a síndrome do urso e a aerofagia (NINOMIYA et al., 2013). Além disso, já foi verificado que o gene *DRD4* influencia o comportamento de outras espécies animais, como cães (HEJJAS et al., 2009; WAN et al., 2013) e bovinos (GLENSKE et al., 2011).

O interesse no gene *DBH* ("dopamine beta-hydroxylase") no presente estudo é justificado por ele também estar relacionado ao transporte da dopamina. Além disso, o gene *DBH* está localizado relativamente próxima à QTL para temperamento de cavalos, o que pode resultar em desequilíbrio de

ligação entre o QTL e o gene *DBH*. O gene *DBH* já foi estudado em cães, onde foram avaliadas quatro diferentes raças através de questionário adaptado de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade para humanos (HEJJAS et al., 2007). Nesse estudo, foi encontrada associação entre polimorfismo do gene *DBH* e o nível de atenção dos cães dessas raças. Na espécie equina foi identificado a SNP A758T no gene *DBH* na raça PSI (MOMOWASA et al., 2005). Este SNP provoca alteração da proteína produzida, no entanto, ainda não foi estudada a associação entre este SNP e o temperamento dos equinos. Como mencionado anteriormente, o BH tem em sua origem grande "pool" genético representado por mais de uma dezena de raças equinas, inclusive o PSI. No entanto, não foram encontrados estudos na literatura sobre a existência do SNP A758T nas raças equinas do tipo "warmblood", isto é, raças equinas usadas nos esportes equestres olímpicos, que no caso do Brasil é representada pela raça BH.

1.6. Objetivos

Esse estudo teve como objetivos:

- Verificar a existência da variabilidade na expressão da reatividade de potros BH submetidos ao teste de novo objeto;
- Verificar se existe variabilidade genética na amostra de potros avaliados na posição do SNP A758T no gene *DBH*.

2. Material e métodos

2.1. Animais e locais de estudo

Foram utilizados 259 equinos da raça BH, todos sem doma, criados em condições de pasto e com idades variando de um a três anos. Estes animais pertenciam aos planteis do Polo Regional Alta Mogiana (Colina/SP), do Haras

Itapuã (Arandu/SP) e da Coudelaria do Rincão (São Borja/RS), onde foram realizadas as avaliações.

2.2. Análise comportamental

A avaliação da reatividade e rapidez de habituação foi feita de acordo com teste comportamental a um objeto desconhecido (feito com um guarda-chuva), adaptado de diversas pesquisas realizadas sobre este tema (BORSTEL et al., 2011; LEINER & FENDT, 2011; MUNSTERS et al., 2013; VISSER et al., 2001). O teste foi realizado em cercados de forma retangular (aproximadamente 15m X 10m), ao qual os animais não estavam habituados. O teste foi realizado com cada cavalo individualmente, sendo que os outros animais ficavam em outro recinto e não tinham contato visual com o cavalo que estava sendo testado.

Cada cavalo foi solto no cercado com o guarda-chuva aberto já fixado na cerca do cercado, à altura de 1 metro do chão. Foi dado 1 minuto para sua acomodação sem a presença de humanos dentro do cercado (tempo semelhante ao usado nas provas equestres). Após esse primeiro minuto o condutor entrou andando no cercado e ficou posicionado próximo ao centro deste portando chicote de guia padrão (Figura 6). O objetivo do condutor era fazer o animal permanecer em trote médio junto à cerca do cercado realizando voltas sem parar por dois minutos (1 minuto no sentido horário e 1 minuto no sentido anti-horário). O trote do cavalo é caracterizado como andamento de rapidez moderada onde os membros diagonais se movimentam de forma associada. Para manter o animal no trote, o condutor realizava movimentos leves e padronizados com o chicote de guia em direção à garupa do cavalo, sem que, no entanto, houvesse contato do chicote com o corpo do cavalo para evitar estressar o animal.

Para quantificar a reatividade e a rapidez de habituação ao novo objeto o animal foi submetido à avaliação qualitativa do comportamento (QBA- *Qualitative Behavior Assessment*), método com boa aceitação como aferidor do temperamento em cavalos (NAPOLITANO et al., 2008, FLEMING et al., 2013,

DIUGAN; POPESCU; SPINU, 2014), bem como em outras espécies de animais domésticos (RUTHERFORD; DONALD; LAWRENCE, 2012, SANT'ANNA & PARANHOS DA COSTA, 2013; STOCKMAN et al., 2014). O QBA foi analisado durante os 2 minutos de exercício no cercado de cada cavalo e registrado na planilha de controle ao final desses 2 minutos de exercícios, sempre pela mesma pessoa (observador posicionado do lado de fora do cercado).

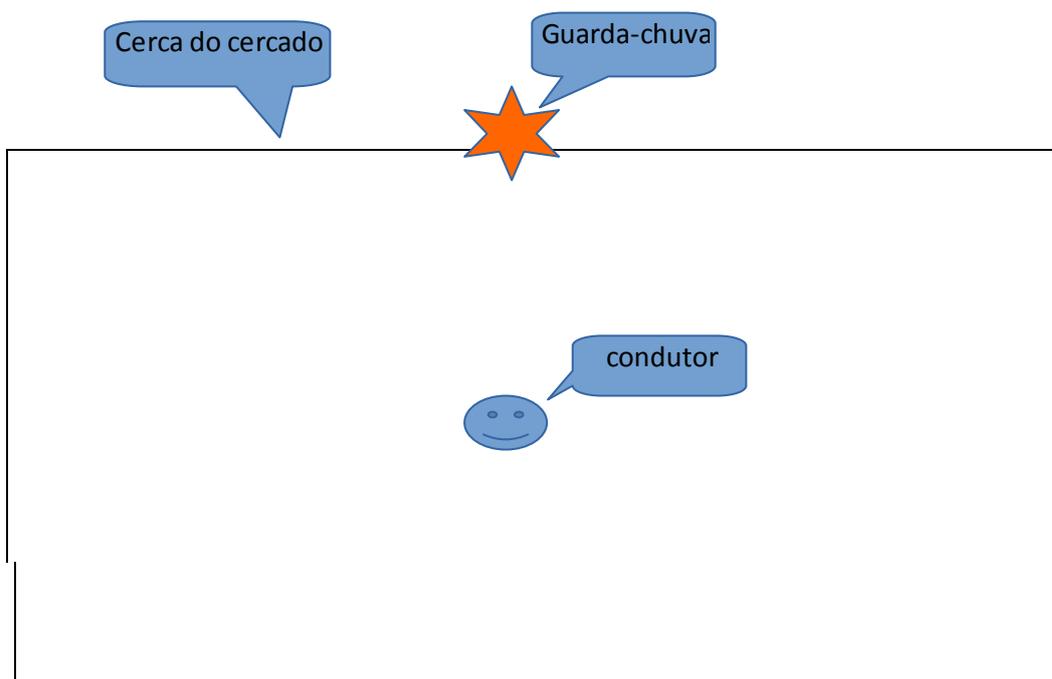


Figura 6 - Diagrama do cercado onde foi realizado o teste do novo objeto, com caracterização do posicionamento do guarda-chuva e do condutor.

As definições dos termos usados no QBA encontram-se descritas na Tabela 1, os quais foram adaptadas de artigos que tratam da reatividade de cavalos (VISSER et al., 2003; NAPOLITANO et al., 2008). A avaliação de cada termo do QBA foi feita em escala analógica de 100mm, aonde o valor mínimo (0mm) representa a não ocorrência do comportamento e o valor máximo (100mm) está relacionado à manifestação intensa do comportamento descrito. A distância mínima que o cavalo mantém do guarda-chuva não foi auferida de modo objetivo, pois julgamos que muitos outros fatores de difícil controle podem intervir nesta variável, como a habilidade momentânea do condutor em antecipar os movimentos do animal e a localização do restante da tropa.

Tabela 1 - Definições das categorias de comportamento dos equinos utilizadas na aplicação da avaliação qualitativa do comportamento (QBA), com caracterização as situações em que os comportamentos resultaram em pontuações mínimas e máximas para cada um dos termos avaliados.

Termo	Definição	Mínimo	Máximo
Relaxado (RELAX)	Relacionado à tensão muscular do pescoço, à altura da cabeça e à respiração intensa e barulhenta (bufar).	Animal apresenta pescoço tenso, cabeça alta e bufa mais de uma vez.	Animal apresenta pescoço sem tensão aparente, cabeça baixa e não bufa.
Focado (FOCAD)	Relacionado ao foco nos comandos do condutor, posicionando pescoço e cabeça levemente voltados para o interior do cercado.	Animal não foca no condutor, mas sim em outros objetos ou pessoas; a cabeça e o pescoço não ficam voltados para o interior do cercado.	Foca no condutor, permanecendo com a cabeça e pescoço voltados para o interior do cercado durante todo o tempo.
Confiante (CONFI)	Relacionado à aceitação com naturalidade à situação de manejo ao qual está sendo submetido.	Animal apresenta reação exagerada a tudo, prejudicando o correto desenrolar das duas séries de exercício.	Animal não apresenta demasiada reação à nada e realiza com naturalidade as duas séries de exercícios.
Positivamente curioso (POS.CUR)	Relacionado ao desejo exploratório do animal, em que se dirige às potenciais ameaças (objeto novo ou outras ameaças) com o intuito de investigá-las sem demonstrar medo.	Animal não se aproxima de nada que represente ameaça potencial.	Animal se aproxima e cheira uma ou mais ameaças potenciais.
Precavido (PRECAV)	Relacionado à apresentação de comportamento de fuga ou esquiva em relação a algo ou alguém.	Animal não apresenta comportamento de fuga ou esquiva.	Animal apresenta comportamento exagerado de fuga ou esquiva (de grande intensidade ou muito frequente).
Agitado (AGIT)	Relacionado à intensidade da movimentação de cabeça e pescoço e à manutenção do ritmo do trote.	Animal apresenta baixa intensidade de movimentação de cabeça e pescoço. Além disso, mantém-se no trote médio durante todo o tempo de exercício e não 'quica no lugar' (interrupções rápidas e abruptas no ritmo).	Animal apresenta movimentação intensa de cabeça e pescoço. Além disso, acelera abruptamente o ritmo de trote ou 'quica no lugar' por mais de uma vez.
Desesperado (DESESP)	Relacionado ao respeito à cerca de contenção do cercado.	Animal respeita a cerca e não tente ultrapassá-la.	Animal fica procurando desesperadamente uma saída do redondel.
Confuso (CONFU)	Relacionado ao instinto gregário dos cavalos, demonstrado através da procura pela tropa e emissão de vocalização.	Cavalo não fica procurando pela tropa e não emite vocalização.	Cavalo fica constantemente procurando pela tropa e emitindo vocalizações.

2.3. Análise laboratorial do gene *DBH*

Foram coletadas amostras do pelo da crina (junto com o bulbo capilar) tomadas na região da cernelha de subamostrada de 20 potros não aparentados e com fenótipo representativo da amostra avaliada neste estudo. Nos casos em que o potro estivesse tosado, foram coletados os pelos da cauda alternativamente.

As extrações de DNA das amostras de pelo coletadas foram realizadas a partir da metodologia descrita por Lima (2003). Cerca de 40 folículos/animal foram depositados em tubo de microcentrifuga (1,5 mL) e centrifugados rapidamente. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de solução TE-Tween (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20) em cada amostra, seguindo à incubação a 65°C por 90 minutos com agitação periódica; após esse período, foram adicionados 2 μ L de proteinase K/tubo (600 μ g/ μ L), seguido de incubação a 55°C por 6 horas com agitação periódica; e em seguida incubação a 37°C por 16 horas.

Após esses procedimentos, foi adicionado 1 volume de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico) para 1 volume de amostra, agitando-se vigorosamente os tubos por 10 segundos em agitador automático. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm a 23 °C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo.

O volume final dessa fase (de aproximadamente 300 μ L) foi utilizado para fazer a precipitação do DNA com uso de 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (aproximadamente 30 μ L) e etanol absoluto gelado (aproximadamente 1 mL). Após misturar por inversão, os tubos foram colocados no freezer – 80°C por 1 hora. Em seguida foi realizada nova com centrifugação a 4°C por 25 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA remanescente foi completamente seco em temperatura ambiente, e em seguida armazenado em 100 μ L de TE (10:1).

As amostras de DNA genômico tiveram a região do gene *DBH* onde a SNP A758T está localizada amplificada por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) (Figura 7). Foram utilizados os *primers* descritos por Momowasa et

al. (2005). As reações foram preparadas com volume final de 50 μ L, contendo 150 ng de DNA genômico, 2,5 μ L de cada *primer*, 5 μ L de PCR buffer, 3 μ L $MgCl_2$, 5 μ L de dNTPs e 0,5 μ L de *Taq* DNA polimerase. Após desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, a amplificação foi realizada em 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. A extensão final foi conduzida a 72°C por 7 minutos.

```

661 aggagaccac ctattggtgc tacattactg agcttcccga cggttcccc cggcaccata
721 tcgtcatgta tgagcccatt gtcaccgaagg gcaacgaggc cctggtgcac cacatggagg
781 tcttccagtg cgccgccgag ttcgagagct tccccagtt caacggacc tgcgactcca
841 agatgaagcc cagccgcctc aactactgcc gcaacgtgct ggccgcctgg gcctggggcg
901 ccaaggcctt ttactaccca gaggaagctg gccttgcttt cgggggtgcc gggctctcca

```

Figura 7 - Região do gene *DBH* amplificada por PCR (primer *forward*, primer *reverse* e posição da SNP em destaque).

Os produtos de PCR resultantes das 20 amostras foram colocados em gel de agarose à 0,5% e passaram por eletroforese para a verificação do tamanho dos fragmentos amplificados. Todas as etapas laboratoriais descritas acima foram feitas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, UNESP.

Os produtos purificados do PCR foram analisados por meio da técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs) em sequenciador automático ABI 3730 XL do CREBIO (Centro de Recursos Biológicos) da mesma faculdade. As sequências obtidas foram analisadas com o programa CodonCode Aligner, disponível no site <http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>.

2.4. Análise dos dados

Foi utilizado o método estatístico multivariado de caráter exploratório denominado análise de fatores. A análise de fatores é ferramenta puramente descritiva, cujo objetivo é condensar a informação contida em determinado

número de variáveis originais em conjunto menor denominado de fatores (FERRAUDO, 2014).

Os fatores são combinações lineares das variáveis originais e são representados por autovalores que representam a proporção da variância dos dados retida por cada fator. Além disso, a análise de fatores produz, através do método dos componentes principais a carga dos fatores. A carga dos fatores é a correlação entre as variáveis originais, que neste estudo são representadas pelos adjetivos utilizados no QBA e o fator. Foi utilizado o software Statistica (Statsoft, versão 7) para a aplicação do método.

Utilizamos o procedimento PROC FREQ para fazer a análise da distribuição da frequência populacional do fator 1, que foi considerado como sendo o índice de reatividade dos animais, já que retém a maior proporção da variância dos dados analisados. Posteriormente, foi verificada a normalidade da distribuição dos dados do fator 1 pelo procedimento PROC UNIVARIATE. Ambos procedimentos foram feitos no pacote estatístico SAS (SAS 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC). Além disso, analisamos através do Teste de Qui-Quadrado se o fator 1 se distribui igualmente entre potros machos e fêmeas e entre as três diferentes fazendas de criação para identificar o tipo de seleção utilizada nestes criatórios.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise de fatores

O fator 1 foi responsável por 58,84% da variância e por isso foi considerado como sendo a melhor medida do fenótipo dos animais, logo passou a ser usado como o índice de reatividade dos animais no presente estudo. O fator 2 não foi analisado com maior profundidade por ser responsável por apenas 12,89% da variância fenotípica. Na Figura 8 é possível observar a nítida divisão dos animais em dois grupos: um grupo com os animais com altos valores para as variáveis RELAX, FOCAD, CONFI e POS.CUR e no outro grupo de animais com altos valores para PRECAV, AGIT, CONF e DESESP. A

importância relativa de cada variável original para o fator 1 e fator 2 é apresentada na Tabela 2, que exibe as cargas dos fatores. No fator 1, as cargas dos fatores positivas para RELAX, FOCAD, CONFI e POS.CUR e negativas para PRECAV, AGIT, CONF e DESESP demonstram com clareza o caráter antagonico dos adjetivos usados no QBA. Além disso, confirmam o valor do fator 1 como bom aferidor da variação comportamental dos animais e sua divisão em dois grupos bem distintos.

Tabela 2 - Cargas dos fatores das variáveis originais para o fator 1 e fator 2.

VARIÁVEIS ORIGINAIS	Fator 1	Fator 2
RELAX	0,900904	0,018918
FOCAD	0,810084	-0,123792
CONFI	0,885656	-0,309145
POS. CUR	0,696240	-0,465863
PRECAV	-0,800932	0,216171
AGIT	-0,587371	-0,567122
DESESP	-0,771660	-0,255826
CONFU	-0,623728	-0,519464
% Variância total	0,588499	0,128991

Resultados semelhantes foram encontrados em cavalos analisados por QBA durante as inspeções veterinárias em provas de enduro (FLEMING et al., 2013). Nesse estudo foi observado que 43% da variância pode ser explicado por um único componente principal que diferenciava os animais em um grupo "calmo, contente e relaxado" e outro grupo "agitado, bravo e incomodado". Proporções ainda maiores da variância explicada por um único componente principal foram encontradas em estudos de temperamento de cavalos avaliados por QBA para avaliar seu comportamento quando expostos à ambiente desconhecido (NAPOLITANO et al., 2008). Esses autores explicaram 60% da variância dividindo os animais em um grupo denominado "calmo" e outro "nervoso". Existem também comparações entre diferentes raças de cavalos, onde oito raças foram analisadas para diversos componentes de personalidade dos animais (LLOYD et al., 2008). Neste estudo os termos ansiedade e excitabilidade apresentaram a maior variabilidade entre todos os componentes de personalidade avaliados, sendo que o autor utilizou os

adjetivos tenso, inseguro, medroso, agitado e apreensivo para caracterizar esses dois componentes da personalidade dos cavalos. Além disso, o fato de que os animais cuja personalidade reúnem características como excesso de ansiedade e excitabilidade geralmente apresentarem maior reatividade quando submetidos à testes de novo objeto já foi verificada em estudo anterior (JICHI et al., 2013).

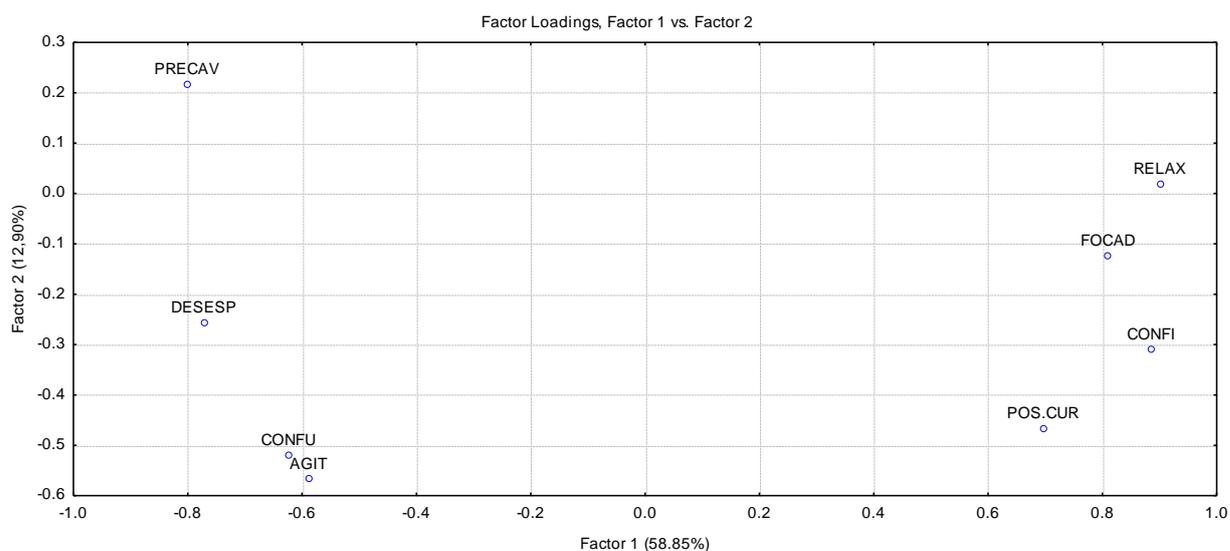


Figura 8 - Projeção espacial das variáveis originais do QBA no fator 1 e fator 2.

3.2. Análise da distribuição amostral do fator 1

Quando analisamos a distribuição amostral do fator 1 para a população total estudada, verificamos que está ocorrendo seleção direcional no sentido de produzirmos animais menos reativos (Figura 9).

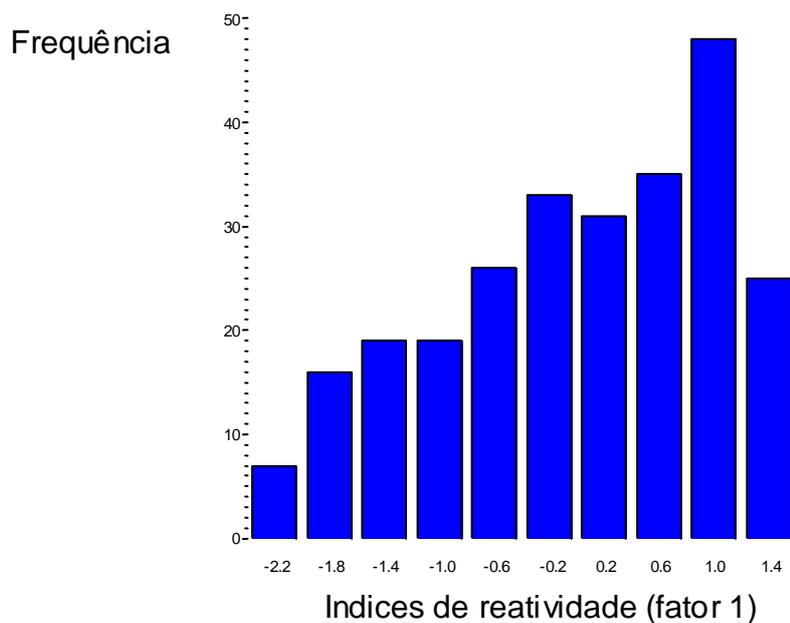


Figura 9 - Distribuição dos valores do índice de reatividade (definido pelo fator 1 da análise de fatores) para a amostra de potros estudada.

Foi constatado, através do Teste do Qui-Quadrado (Tabela 3), que o sexo não influenciou os resultados obtidos para o fator 1. Isto pode ser confirmado ao constatarmos a semelhança da distribuição amostral por sexo dos animais (Figura 10).

Tabela 3 - Resultado do Teste do Qui-Quadrado ($p=0,71$) para proporções de animais machos e fêmeas e proporções de animais com fator 1 positivo e negativo.

	Fêmeas	Machos	Total
Frequências observadas de animais com fator 1 positivo	71	68	139
Frequências esperadas de animais com fator 1 positivo	72,452	66,548	
Frequências observadas de animais com fator 1 negativo	64	56	120
Frequências esperadas de animais com fator 1 negativo	62,548	57,452	
			259

Frequência

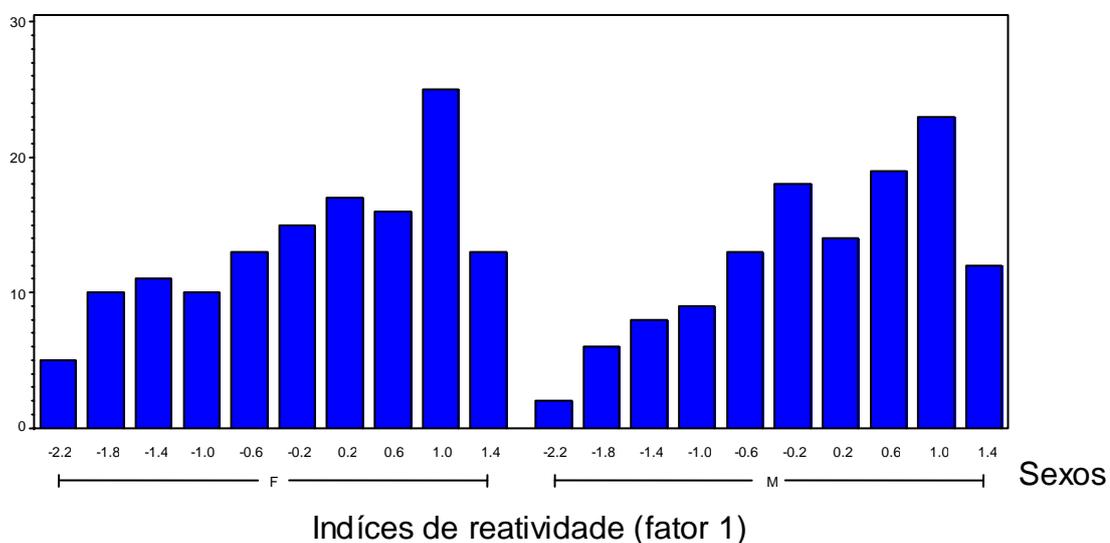


Figura 10 – Distribuição dos valores do índice de reatividade (definido pelo fator 1 da análise de fatores) em função do sexo dos potros (F = fêmeas e M = machos).

De acordo com a carga dos fatores do fator 1 quanto maior o índice de reatividade menor é a reatividade do animal, já que os atributos ligados à baixa reatividade tiveram sinal positivo. Dito isso, foi identificado que 36,15% dos animais apresentaram índice de reatividade abaixo de -0,30. O valor de -0,30 para o índice de reatividade adotado aqui foi subjetivamente considerado por nós como um patamar no qual o nível de estresse que provocamos aos animais através do treinamento hípico seria talvez de magnitude demasiadamente grande para o bem-estar desses animais. Isto é, levantamos a hipótese de que animais muito reativos são submetidos à estresse altíssimo com o treinamento e as competições hípicas. Submeter esses animais à esse estresse tem implicações éticas que precisam serem analisadas com mais atenção pela sociedade. Não foram encontrados estudos na literatura que definissem esse patamar e acreditamos que este possa ser campo fértil para novos estudos de bem-estar dos equinos.

Estudos futuros poderão definir um patamar adequado para o índice de reatividade mínimo aceitável sem que ocorra descarte inapropriado de cavalos

aptos ao esporte. Além disso, a adoção de um patamar mínimo aceitável para o índice de reatividade pela ABCCBH para o registro de animais pode contribuir para a melhoria da personalidade da raça como um todo.

Neste estudo, foi considerado de forma igualmente subjetiva que os animais com índice de reatividade abaixo de -1.3 tem boas possibilidades de serem classificados como "patologicamente ansiosos" (13,85% dos animais do estudo). O animal "patologicamente ansioso" pode ser definido como aquele que tem reações exageradas e incompatíveis com o contexto e que carecem de valor adaptativo para a espécie (OHL; ARNDT; STAA, 2008). Esse tipo de reação é verificado em animais selvagens, animais domésticos e humanos e possui causas ainda não esclarecidas, mas que provavelmente tem sua origem tanto em fatores genéticos como ambientais. Animais desse tipo são um risco a si próprios e as pessoas envolvidas com seu manejo e a não utilização de animais "patologicamente ansiosos" em provas hípicas certamente contribuiria para a diminuição de acidentes equestres. É oportuno mencionar que nos testes pilotos desse estudo houve situação de risco extremo a um animal, onde este indivíduo entrou em total desespero durante a condução da série de exercício e tentou saltar a cerca de contenção do cercado, o que fortuitamente não teve consequências mais sérias, mas poderia ter ocasionado acidente grave.

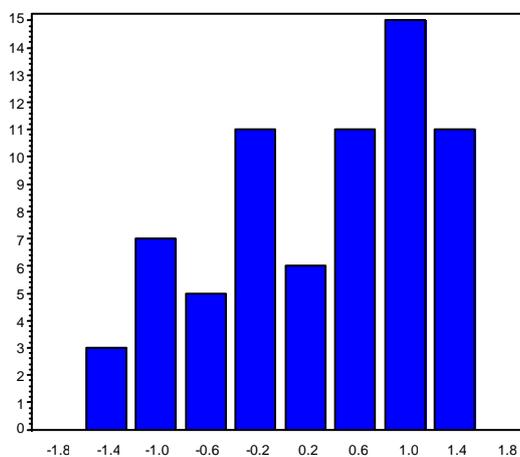
Como esperado, o resultado do procedimento PROC UNIVARIATE acusou a falta de normalidade dos dados da amostra. No entanto, foi realizado o procedimento PROC UNIVARIATE nos diferentes criatórios e observamos que em pelo menos uma das fazendas, o Haras Itapuã, os dados do fator 1 apresentam distribuição normal. Essa diferença entre os criatórios ficou evidenciada ao realizar o Teste de Qui-Quadrado por fazenda (Tabela 4). Observamos que as três fazendas estão produzindo produtos que diferem entre si quanto à probabilidade de apresentarem valores positivos ou negativos para o fator 1.

Tabela 4 - Resultado do Teste do Qui-Quadrado ($p=0,012$) para proporções de animais de cada fazenda e proporções de animais com fator 1 positivo e negativo.

	Rincão	Colina	Itapuã	Total
Frequências observadas de animais com fator 1 positivo	89	43	7	139
Frequências esperadas de animais com fator 1 positivo	88,552	37,031	13,0417	
Frequências observadas de animais com fator 1 negativo	76	26	18	120
Frequências esperadas de animais com fator 1 negativo	76,448	31,969	11,583	
				259

A fazenda de Colina (Figura 11) e a Coudelaria do Rincão (Figura 12) estão selecionando para potros com índice de reatividade positivo, enquanto que o Haras Itapuã (Figura 13) não parece estar selecionando para a reatividade dos animais.

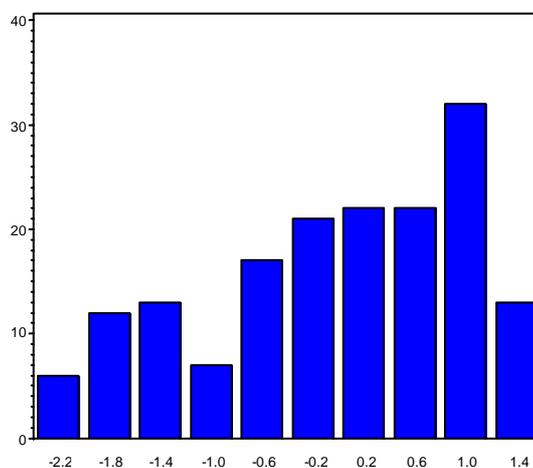
Frequência



Índice de reatividade (fator 1)₁

Figura 11 - Distribuição dos valores do índice de reatividade (definido pelo fator 1 da análise de fatores) para a amostra de potros estudada em Colina\SP.

Frequência



Índice de reatividade (fator 1)

Figura 12 - Distribuição dos valores do índice de reatividade (definido pelo fator 1 da análise de fatores) para a amostra de potros estudada na Coudelaria do Rincão/SP.

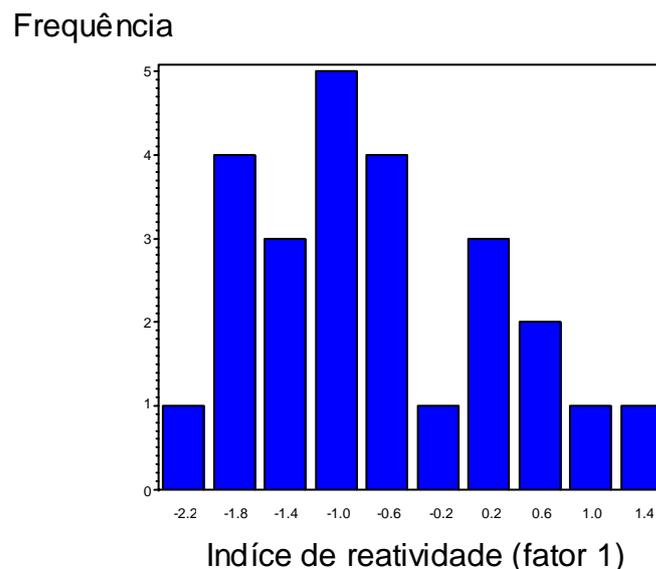


Figura 13 - Distribuição dos valores do índice de reatividade (definido pelo fator 1 da análise de fatores) para a amostra de potros estudada no Haras Itapuã em Arandu\SP.

A distribuição normal presente no Haras Itapuã para o índice de reatividade provavelmente é decorrente da própria origem genética das raças "warmbloods", já que as raças "coldbloods" costumam ser mais linfáticas e menos reativas, enquanto as raças "hotbloods" tendem a serem mais agitadas e reativas. Apesar da herdabilidade da reatividade em cavalos ser considerada baixa (0,17), foi encontrado componente genético para este componente do temperamento (ROTHMANN et al., 2014). A modificação do formato da curva de distribuição nas outras duas fazendas analisadas neste estudo sugere a eficácia da seleção para reatividade nos equinos. O fato de ainda estarmos com elevado porcentual de animais altamente reativos provavelmente se justifica pela simples falta de programas de melhoramento genético bem estruturados e com objetivos de longo prazo bem definidos nos criatórios estudados ou na raça BH em geral.

No entanto, existe também a questão que ao produzirmos animais mais calmos possamos estar produzindo animais com pior desempenho atlético, ou seja, pode haver alguma correlação negativa entre o índice de reatividade e qualidade do salto, por exemplo. Isto justificaria a seleção não direcional atualmente em curso no Haras Itapuã. Os "hotbloods" são geralmente mais

agitados, reativos e geralmente mais leves em termos de peso corporal. A noção de que esses animais são mais respeitosos com as varas, isto é, procuram não cometer tantas faltas ao saltarem os obstáculos de um percurso, encontra muitos adeptos entre criadores e cavaleiros. Contudo, é certo que a necessidade de produzir um animal com esses atributos encontrará seu limite na necessidade de produzir cavalos de temperamento calmo e boa potência muscular, características dos "coldbloods". Além disso, esse tipo de correlação negativa entre reatividade e performance dos animais geralmente não é confirmada por estudos na espécie equina (BORSTEL et al., 2013).

Outro fator a ser considerado é a alta plasticidade fenotípica presente em algumas espécies de animais, onde um indivíduo muda seu fenótipo de acordo com as variações ambientais. Esta é uma resposta alternativa às variações ambientais frequentes (RUEFFLER et al., 2006). Isto provavelmente está relacionado à um histórico de flutuações na direção e/ou intensidade da pressão da seleção sofrida por uma população, onde os animais acabam por desenvolver diferentes estratégias comportamentais para sobreviverem (DINGEMANSE & RÉALE, 2005). Na espécie equina, isto pode ser exemplificado ao identificarmos indivíduos bastante reativos em um primeiro momento, porém de rápida habituação aos objetos desconhecidos, isto é, mudam seu fenótipo de acordo com as circunstâncias à que são submetidos ao longo de sua vida. Diferentes personalidades de cavalos podem ter reatividade bastante diferente em um primeiro momento, mas que podem ser igualmente satisfatórias depois de algum treinamento hípico. Esta característica permite o uso com sucesso de animais mais reativos nos esportes equestres, porém que ficam menos reativos com o avançar da idade e do treinamento. A plasticidade fenotípica evidencia a necessidade da adoção cuidadosa do índice de reatividade, pois ele deve ser sensível o suficiente para captar os diferentes mecanismos adotados pelos cavalos ao passarem por situações de estresse e evitarmos o descarte de animais desnecessariamente.

3.3. Análise da variabilidade do polimorfismo do gene *DBH*

A amplificação por PCR do fragmento do gene *DBH* foi realizado com sucesso e foi possível a genotipagem das 20 amostras (Figura 14). Os fragmentos na lateral esquerda do gel são o marcador molecular de 1000 pb, utilizado para auxiliar na identificação aproximada do tamanho do fragmento de DNA amplificado. A região amplificada por PCR continha cerca de 130 pares de bases, o que pode ser verificado pela sua posição entre as bandas de 100 pb e 200 pb do marcador molecular.

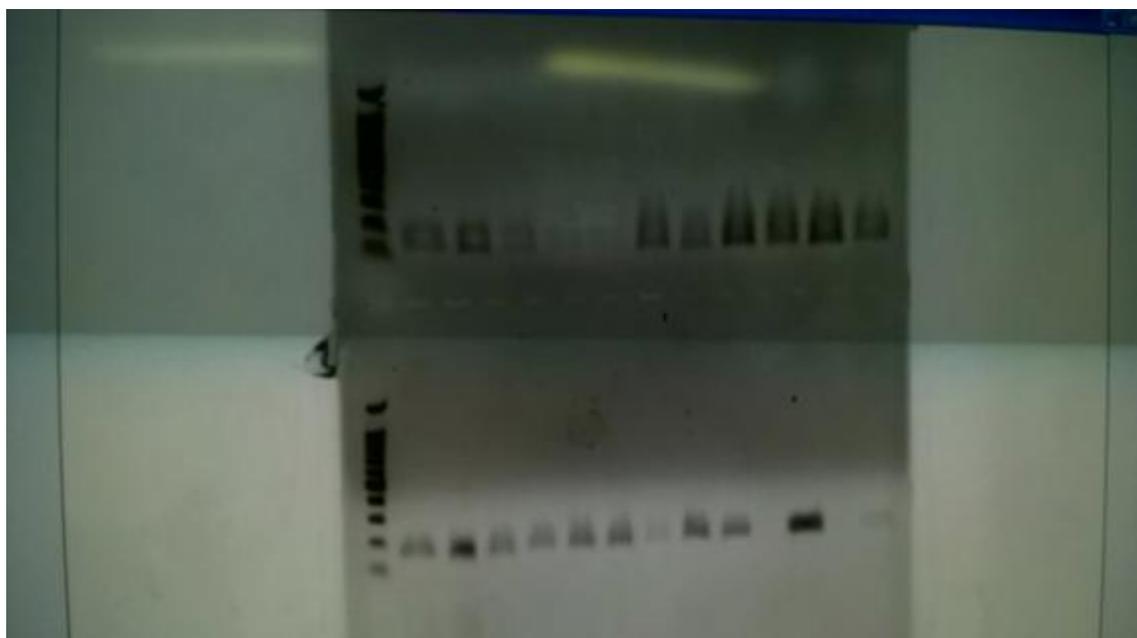


Figura 14 - Padrão de amplificação de segmento de 130 pb do gene *DBH* equino obtido na análise por PCR em gel de agarose a 3% de alta resolução.

O resultado do sequenciamento identificou a inexistência da troca da base nitrogenada adenina por timina na posição da SNP A758T, isto é, não houve variabilidade genética no fragmento de DNA amplificado. O nosso estudo tem como limitação o número reduzido de animais genotipados e por isso não é conclusivo para a raça. No entanto, devido ao fato dos 20 animais genotipados serem não aparentados e possuírem variabilidade representativa da população estudada, julgamos que a probabilidade da existência da SNP A758T no restante dos 240 potros era muito pequena e não justificava a

utilização de recursos financeiros expressivos para genotipagem de todos os animais do estudo.

A falta de variabilidade nesta posição do gene *DBH* evidencia a necessidade de estudos específicos para cada raça, ou ainda, para cada população que se deseja implementar programa adequado de melhoramento genético. A raça BH tem em sua origem grande quantidade de raças, inclusive a PSI na qual o SNP A758T foi identificado. No entanto, a proibição do uso da inseminação artificial (IA) na raça PSI pode ser a explicação para essa diferença no gene *DBH* das duas raças. O estudo que encontrou o SNP A758T foi realizado no Japão e com a proibição do uso da IA a reprodução do PSI fica restrita à monta natural com garanhões residentes no próprio país. Com isso, o intercâmbio de material genético para o cavalo PSI do Japão diminuiu significativamente e provavelmente este possui pool genético completamente diferente do BH brasileiro.

Fica a pergunta para futuros estudos se o SNP A758T do gene *DBH* possui alguma variabilidade em outros rebanhos da raça BH. Indagamos ainda se esse SNP está presente em qualquer outra raça do tipo "warmblood", pois ao contrário da raça PSI, o BH faz uso intensivo de sêmen importado de "warmbloods" de origem europeia e é possível especularmos que talvez exista a mesma falta de variabilidade no SNP A758T nesses animais.

Polimorfismos em outras regiões do gene *DBH* que possam estar associadas à reatividade não estão descartados, porém é importante notar que no PSI somente foi verificado um outro SNP silencioso no gene *DBH*, isto é, que não provoca alteração da proteína produzida. No caso do SNP A758T teríamos a substituição do aminoácido Leucina por Glutamina.

O estudo dos genes responsáveis pelo temperamento dos cavalos está apenas iniciando, porém já existem quantidade razoável de genes com SNPs identificados que tem potencial para explicar parte da variabilidade encontrada. Momoyasa et al. (2006) identificou alguns desses SNPs nos genes *BNDF*, *HTR1B*, *HTR2A*, *MAOA*, *MAOB* e *TPH2*, porém todas em regiões não codificantes ou SNPs silenciosos. Esses autores também identificaram os SNPs A709G e C771G que provocaram alteração da proteína produzida no gene *HTR1A*, que está relacionado ao metabolismo da serotonina. Recentemente foi verificada associação entre o SNP A709G e a facilidade de

manejo em cavalos PSI, sendo que houve ainda variação no efeito do genótipo dependendo do sexo do animal (HORI et al., 2016).

O estudo dos genes localizados nos QTL apontados por Staiger et al. (2015) também indica alguns genes candidatos que merecem atenção. No QTL para facilidade de manejo este autor destacou dois genes candidatos com função biológica que podem explicar variações de temperamento dos equinos. O primeiro é o gene *DLGAP1*, relacionado à proteína SAPAP1 que por sua vez já teve seus níveis associado a distúrbios comportamentais em humanos (KAJIMOTO et al., 2003). O segundo é gene *PRKCB*, relacionado à proteína quinase C que teve seu metabolismo associado ao medo de ratos após situações de stress (DIEGO-OTERO et al., 2009). No QTL para ansiedade dos equinos merecem destaque os genes *ALDH18A1* e *HSD17B3*. O gene *ALDH18A1* teve mutações associadas à uma grande variedade de doenças psiquiátricas em humanos (BORTOLATO & SHIH, 2011). Enquanto que o gene *HSD17B3* tem seu metabolismo ligado à testosterona que tem seus níveis associados à agressividade dos cavalos em relação a outros animais e à humanos (LINE et al., 1985).

4. Conclusões

O presente estudo identificou grande variabilidade fenotípica na expressão da reatividade de potros BH sem doma, confirmando a distribuição contínua desta característica. Observamos também que os criatórios diferiram entre si quanto à adoção de seleção direcional ou não para a reatividade dos animais. Apesar disso, a presença de animais que podem ser caracterizados como "patologicamente ansiosos", evidencia a necessidade de maior atenção por parte dos criatórios nacionais na seleção de animais com menor reatividade.

O presente estudo evidenciou também que o SNP A758T do gene *DBH*, não está presente na sub-amostra de 20 animais da raça BH genotipados neste estudo e, portanto, desestimula pesquisas futuras com essa SNP na raça BH.

5. Referências

ABCCBH (Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Brasileiro de Hipismo). Histórico BH. Disponível em http://brasileirodehipismo.com.br/site/nhtml/nstbh_historicobh.asp. Acesso em dezembro de 2016.

AGUIRRE, A. J.; APIQUIÁN, R.; FRESÁN, A.; CRUZ-FUENTES, C. Association analysis of exon III and exon I polymorphisms of the dopamine D4 receptor locus in Mexican psychotic patients. **Psychiatry Research**, v. 153, p. 209–215, 2007.

ARNEIRO, L.C.M. **Caracterização da variabilidade de genes relacionados ao desenvolvimento muscular, fertilidade e temperamento em equinos da raça Mangalarga**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2011.

BECKER, K.; BLOMEYER, D.; EL-FADDAGH, M.; ESSER, G.; SCHMIDT, M. H.; BANASCHEWSKI, T.; LAUCHT, M. From Regulatory Problems in Infancy to Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Childhood: A Moderating Role for the Dopamine D4 Receptor Gene? **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 5, p. 798-803, 2010.

BORTOLATO, M.; SHIH, J. C. Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: Preclinical and clinical evidence. **International Review of Neurobiology**, v. 100, p. 13-42, 2011.

BORSTEL, U. K. V.; EUENTE, S.; KONIG, S.; GAULY, M. Equine behaviour and heart rate in temperament tests with or without rider or handler. **Physiology & Behaviour**, v. 104, p. 454-463, 2011.

BORSTEL, U. K. V.; PASING, S.; GAULY, M.; CHRISTMANN, L. Status quo of the personality trait evaluation in horse breeding: Judges' assessment of the

situation and strategies for improvement **Journal of Veterinary Behavior**, v. 8, p. 326-334, 2013.

CHRISTENSEN, J. W.; RUNDGREN, M.; OLSSON, K. Training methods for horses: habituation to a frightening stimulus. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, p. 439–443, 2006.

DEFRA (Department for Environment, Food and Rural Affairs). **A report of research on the horse industry in Great Britain**. Defra Publications: London, 2004, 115 p. Disponível em https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/69259/pb9255-bhic-report-040318.pdf. Acesso em fevereiro de 2017.

DIAS, I. M. G.; BERGMANN, J. A. G.; REZENDE, A. C. C.; CASTRO, G. H. F. Formação e estrutura populacional do equino Brasileiro de Hipismo. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 647-654, 2000.

DIEGO-OTERO, Y.; ROMERO-ZERBO, Y.; BEKAY, R., DECARA, J.; SANCHEZ, L.; FONSECA, F.R.; ARCO-HERRERA, I. Alpha-tocopherol protects against oxidative stress in the fragile x knockout mouse: An experimental therapeutic approach for the FMR1 deficiency. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 1011-1026, 2009.

DIMECH, A. Natural selection. Plant Evolution. 2011. Plant Science Portal. Disponível em <http://www.adonline.id.au/plantevol/natural-selection/>. Acesso em dezembro de 2016.

DINGEMANSE, N. J.; RÉALE, D. Natural selection and animal personality. **Behaviour**, v. 142, p. 1165-1190, 2005.

DIUGAN, E.A.; POPESCU, S.; SPINU, M. Qualitative assessment of the young foal's human related behaviour. **Bulletin UASVM Veterinary Medicine**, v. 71, n. 2, p. 517-518, 2014.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **FAOSTAT**. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>. Acesso em dezembro de 2016.

FLEMING, P. A.; PAISLEY, C. L.; BARNES, A. L.; WEMELSFELDER, F. Application of qualitative behavioral assessment to horses during an endurance ride. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 144, p. 80-88, 2013.

FN (Fédération Equestre Nationale). **A guide through the German equestrian world, equestrian sports and breeding in Germany**, 2014. Disponível em http://www.euroequestrian.eu/files/2/11/Horse_Sports_and_Breeding_Juli_2014.pdf. Acesso em fevereiro de 2017.

GLENSKE, K.; PRINZENBERG, E. M.; BRANDT, H.; GAULY, M.; ERHARDT, G. A chromosome-wide QTL study on BTA29 affecting temperament traits in German Angus beef cattle and mapping of DRD4. **Animal**, v. 5, n.2, p. 195–197, 2011.

GOLDSMITH, H.; BUSS, A.; PLOMIN, R.; ROTHBART, M.; THOMAS, A.; CHESS, S.; HIDE, H.; MCCALL, R. Roundtable: What Is Temperament? Four Approaches. **Child Development**, v. 58, n. 2, p. 505-529, 1987.

GRAF, P.; BORSTEL, U. K. V.; GAULY, M. Importance of personality traits in horses to breeders and riders. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 8, p. 316-325, 2013.

HEJJAS, K.; VAS, J.; KUBINYI, E.; SASVARI-SZEKELY, M.; MIKLOSI, A.; RONAI, Z. Novel repeat polymorphisms of the dopaminergic neurotransmitter genes among dogs and wolves. **Mammalian Genome**, v. 18, p. 871–879, 2007.

HEJJAS, K.; KUBINYI, E.; RONAI, Z.; SZEKELY, A.; VAS, J.; MIKLÓSI, A.; SASVARI-SZEKELY, M.; KERESZTURI, E. Molecular and behavioral analysis

of the intron 2 repeat polymorphism in the canine dopamine D4 receptor gene. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, p. 330–336, 2009.

HORI, Y.; OZAKI, T.; YAMADA, Y.; TOZAKI, T.; KIM, H.; TAKIMOTO, A.; ENDO, M.; MANABE, N.; INOUE-MURAYAMA, M.; FUJITA, K. Breed differences in dopamine receptor D4 gene (DRD4) in horses. **Journal of Equine Science**, v. 24, n. 3, p. 31 – 36, 2013.

HORI, Y.; TOZAKI, T.; NAMBO, Y.; SATO, F.; ISHIMARU, M.; INOUE-MURAYAMA, M.; FUJITA, K. Evidence for the effect of serotonin receptor 1A gene (HTR1A) polymorphism on tractability in Thoroughbred horses. **Animal Genetics**, v. 47, n. 1, p. 62-67, 2016.

IICHI, C.; COLLINS, L. M.; CREIGHTON, E.; ELWOOD, R. W. Harnessing the power of personality assessment: subjective assessment predicts behaviour in horses. **Behavioural Processes**, v. 96, p. 47-52, 2013.

KAJIMOTO, Y.; SHIRAKAWA, O.; LIN, X. H.; HASHIMOTO, T.; KITAMURA, N.; MURAKAMI, N.; TAKUMI, T.; MAEDA, K. Synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein (SAPAP) is expressed differentially in phencyclidine-treated rats and is increased in the nucleus accumbens of patients with schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 1831-1839, 2003.

LEINER, L.; FENDT, M. Behavioural fear and heart rate responses of horses after exposure to novel objects: Effects of habituation. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 131, p. 104–109, 2011.

LIMA, S. P. G. **Estudo do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio de crescimento bovino (bGH), em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama.** Dissertação ((Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2003.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. **Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos. Relatório Final.** Piracicaba—SP: CEPEA/ESALQ/USP.2006, 251 p. Disponível em http://www.nucleovet.com/area_aluno/tecnico/cavalos_completo.pdf. Acesso em janeiro de 2017.

LINE, S.W.; HART, B. L.; SANDERS, L. Effect of prepubertal versus postpubertal castration on sexual and aggressive behavior in male horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, p. 249-251, 1985.

LLOYD, A. S.; MARTIN, J. E.; BORNETT-GAUCI, H. L. I.; WILKINSON, R. G. Evaluation of a novel method of horse personality assessment: Rater-agreement and links to behaviour. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 105, p. 205–222, 2007.

LLOYD, A. S.; MARTIN, J. E.; BORNETT-GAUCI, H. L. I.; WILKINSON, R. G. Horse personality: Variation between breeds. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 112, p. 369–383, 2008.

LILJENSTOLPE, C. **Horses in Europe.** Uppsala: Swedish University of Agriculture Science, 2009, 38 p. Disponível em <http://www.wbfs.org/files/EU%20Equus%202009.pdf>. Acesso janeiro de 2017.

MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; KUSUNOSE, R.; KIKUSUI, T.; MORI, Y. Association between equine temperament and polymorphisms in dopamine D4 receptor gene. **Mammalian Genome**, v. 16, p. 538-544, 2005.

MOMOZAWA, Y.; TAKEUCHI, Y.; TOZAKI, T.; KIKUSUI, T.; HASEGAWA, T. Polymorphism identification, RH mapping and association analysis with the anxiety trait of the equine serotonin transporter (SLC6A4) gene. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n.6, p. 619-621, 2006.

MUNSTERS, C. C. B. M.; VISSER, E. K.; BROEK, J. V. D.; OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M. S. V. Physiological and behavioral responses of horses during police training. **Animal**, v. 7, n. 5, p. 822–827, 2013.

NAPOLITANO, F.; ROSA, G. D.; BRAGHIERI, A.; GRASSO, F.; BORDI, A.; WEMELSFELDER, F. The qualitative assessment of responsiveness to environmental challenge in horses and ponies. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 109, p. 342–354, 2008.

NINOMIYA, S.; ANJIKI, A.; NISHIDE, Y.; MORI, M.; DEGUCHI, Y.; SATOH, T. Polymorphisms of the Dopamine D4 Receptor gene in stabled horses are related to differences in behavioral response to frustration. **Animals**, v. 3, p. 663-669, 2013.

OHL, F.; ARNDT, S. S.; STAAY, F. J. Pathological anxiety in animals. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 18-26, 2008.

PTÁČEK, R.; KUZELOVA, H.; STEFANO, G. B. Dopamine D4 receptor gene DRD4 and its association with psychiatric disorders. **Medical Science Monitor**, v. 17; n. 9, p. 215-220, 2011.

ROTHMANN, J.; CHRITENSEN, O. L.; SONDERGAARS, E.; LADEWIG, J. A Note on the Heritability of Reactivity Assessed at Field Tests for Danish Warmblood Horses, **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 2, p. 341-343, 2014.

RUEFFLER, C.; DOOREN, T. J. M. V.; LEIMAR, O.; ABRANSAT, P. A. Disruptive selection and then what? **Trends in Ecology and Evolution**, v.21, n. 5, 2006.

RUTHERFORD, K. M. D.; DONALD, R. D.; LAWRENCE, A. B. Qualitative behavioural assessment of emotionality in pigs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 139 n. 3-4, p. 218-224, 2012.

SANT'ANNA, A. C.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R. Validity and feasibility of qualitative behavior assessment for the evaluation of Nellore cattle temperament. **Livestock Science** v. 157, p. 254-262, 2013.

SBBCH (Stud Book Brasileiro do Cavalo de Hipismo). **Regulamento do Stud Book Brasileiro do Cavalo de Hipismo**, São Paulo: SBBCH. 1999, 38 p. Disponível em <http://brasileirodehipismo.com.br/site/upload/arquivos/regulamento.pdf>. Acesso em dezembro de 2016.

STAIGER, E. A., ALBRIGHT, J. D.; BROOKS, S. A. Genome-wide association mapping of heritable temperament variation in the Tennessee Walking Horse. **Genes, Brain and Behavior**, v. 15, p. 514–526, 2016.

STOCKMAN, C. A.; COLLINS, T.; BARNES, A. L.; MILLER, D.; WICKMAM, S. L.; VERBEEK, E.; MATTHEWS, L.; FERGUNSON, D.; WEMELSFELDER, F.; FLEMING, E. Qualitative behavioural assessment of the motivation for feed in sheep in response to altered body condition score. **Animal Production Science**, v. 54, n. 7, p. 922-929, 2014.

STOCK, K. F. Linear profiling in the Warmblood horse – review & preview, **WBFSH General Assembly & Seminar**. Disponível em http://www.wbfsch.org/files/KFSTOCK_LinProfiling_WBFSH20131007Main.pdf. Acesso em janeiro de 2017.

TRAKEHNER. **Trakehners International**. Disponível em <http://www.trakehners-international.com>. Acesso em dezembro de 2016.

UK (University of Kentucky); KHC (Kentucky Horse Council) **2012 Kentucky Equine Survey**. Lexington: University of Kentucky, 2013, 20 p. Disponível em http://equine.ca.uky.edu/files/2012_equine_survey_report_final_4.pdf. Acesso em dezembro de 2016.

VISSER, E. K.; REENEN, C. G. V.; HOPSTER, H.; SCHILDER, M. B. H.; KNAAP, J. H.; BARNEVELD, A.; BLOKHUIS, H. J. Quantifying aspects of young horse's temperament: consistency of behavioural variables. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 74, p. 241-258, 2001.

VISSER, E. K.; REENEN, C. G. V.; RUNDGREN, M.; ZETTERQVIST, M.; MORGAN, K.; BLOKHUIS, H. J. Responses of horses in behavioural tests correlate with temperament assessed by riders. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 176-183, 2003.

WAN, M.; HEJJAS, K.; RONAI, Z.; ELEK, Z.; SASVAKI-SZEKELY, M.; CHAMPAGNE, F. A.; MIKLÓSI, A.; KUBINYI, E. DRD4 and TH gene polymorphisms are associated with activity, impulsivity and inattention in Siberian Husky dogs. **Animal Genetics**, v. 44, p. 717–727, 2013.

WBFSH (World Breeding Federation for Sport Horses). **Member list as per December 21st 2016** Disponível em http://www.wbfs.org/files/Member_list_as_per_December_21st_2016.pdf.

Acesso em dezembro de 2016.

YILMAZ, Z.; KAPLAN, A. S.; LEVITAN, R. D.; ZAI, C. C.; KENNEDY, J. L. Possible association of the DRD4 gene with a history of attention-deficit/hyperactivity disorder in women with bulimia nervosa. **International Journal of Eating Disorders**, v. 45, p.622-625, 2012.