MARIA PAULA BELTRAN

Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)

São Paulo
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MARIA PAULA BELTRAN

Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1924
FMVZ

Beltran, Maria Paula
Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) / Maria Paula Beltran. – São Paulo : M. P. Beltran, 2007.
105 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira.

1. Puberdade. 2. Precocidade. 3. Leptina. 4. IGF-I. 5. Novilhas Nelore. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

PARECER

Interessado: Maria Paula Beltran

Assunto: Protocolo de Experimentação adotado em experimento animal.

A Presidência da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e após analisar o projeto protocolado sob o número 1209/2007, intitulado: "Influência da leptina na puberdade de novilhas nelore *(Bos taurus indicus)*", no qual foram utilizados 36 (trinta e seis) bovinos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira (UNESP-Araçatuba), constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 13 de novembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 – 05508-270 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 – fones: (11) 309107676/7671 – email: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BELTRAN, Maria Paula
Título: Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

"Nada é fácil, nada nesse mundo é dado de presente, tudo precisa ser aprendido com muito esforço. Um homem que vai em busca do conhecimento deve ter o mesmo comportamento de um soldado que vai para a guerra: bem desperto, com medo, com respeito e com absoluta confiança. Se seguir esses requisitos, pode perder uma batalha ou outra, mas jamais irá lamentar-se do seu destino."

Carlos Castañeda

AGARDECIMENTOS

Ao meu orientador, Guilherme de Paula Nogueira, a quem nunca deixei de admirar.

Aos Professores Mario Binelli e Ed Hoffmann Madureira, pelas valiosas contribuições.

Ao prof Mário Jefferson Quirino Louzada, do departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – DAPSA, do curso de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba por ceder seu espaço para que eu pudesse alojar os animais necessários para o experimento de produção de anticorpos.

Às Professoras Cáris Maroni Nunes e Luzia Helena Queiroz do DAPSA, pela atenção e disponibilidade durante o desenvolvimento dos protocolos de produção de anticorpos.

À Iraci Morais Machado, secretária do DAPSA, pelas ajudas constantes.

À Harumi Doi Shiraishi, secretária do departamento de Reprodução Animal – VRA, da Universidade de São Paulo, pela inestimável ajuda, paciência e simpatia.

Aos queridos professores do VRA, Ed Hoffmann Madureira, Rubens Paes de Arruda, Mario Binelli e Anneliese de Souza Traldi, pelos ensinamentos e pelos bons momentos de descontração em Pirassununga.

À bibliotecária Elza Maria Rosa B. Faquim, pelas correções finais da tese e elaboração da ficha catalográfica.

Aos pesquisadores do INRA, Yves Chilliard e Carole Delavaud pelo fornecimento do anticorpo específico contra leptina bovina e pela colaboração com o desenvolvimento do trabalho

À amiga Devani Mariano Pinheiro, não só uma companheira de laboratório, mas uma grande amiga, com quem dividi horas preparando ensaios e quebrando a cabeça, ao seu

marido, Nirmem Carlos Pinheiro, o Cal, e a Lara, filha linda. Vocês foram a família que escolhi em Araçatuba. Obrigado pela acolhida nos bons e maus momentos, pelos conselhos e principalmente pela amizade. Sinto muito a falta de vocês.

Aos grandes amigos Cristiane Valêncio, Mariana Petrucci e Rafael Cipriano. Pessoas que conheci durante o transcorrer esse trabalho e que extrapolaram os limites da amizade. Amigos com quem não preciso de palavras

Aos amigos e companheiros da "casa do VRA" em Pirassununga: Karen Peres, Raquel Helena Rocha Fernandes, José Rodrigo Valim Pimentel, Fernando Pardo, e à Lindsay Gimenes que não me deu sossego nem em Araçatuba!

À minha irmã, Maria Lúcia e ao seu marido Chedo, por sempre me receberem tão bem em todas as minhas estadas em São Paulo.

E principalmente aos meus pais, por estarem ao meu lado, amparando sempre.

RESUMO

BELTRAN, M. P. **Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*).** [Possible effects of plasmatic leptin and IGF-I on puberty and sexual precocity of Nelore heifers *(Bos taurus indicus*)]. 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de leptina e IGF-I do 8° ao 16° mês de idade de 36 novilhas Nelore e comparadas com a idade à primeira ovulação e precocidade sexual. Para a quantificação da leptina, foi validado um radioimunoensaio (RIA) utilizando anticorpo produzido contra leptina recombinante eqüina após inoculação em coelho. A especificidade, estabilidade, taxa de recuperação e efeito matriz indicaram que o ensaio foi adequado para a quantificação de leptina plasmática bovina. O IGF-I foi quantificado por Kit comercial (DSL). As amostras de sangue foram colhidas em intervalos de 4 dias e avaliadas nos 60 dias retrospectivos à primeira ovulação e de amostras mensais do 8° ao 16° mês de idade. A maioria das novilhas (83,3%) ovulou até o final do experimento e foram divididas em prenhes até os 16 meses de idade (33,3%), formando o grupo precoce (P), e não prenhes (50%), formando o grupo Não Precoce (NP) 16,7% das novilhas não ovularam (chamadas de NO) até o final do experimento. Não houve diferença ($P > 0,05$) na idade à primeira ovulação entre os grupos P (439±27,9 dias) e NP (445±36,8 dias). O peso aumentou ($P < 0,01$) nos 3 grupos, não diferiu ($P > 0,05$) entre as novilhas P e NP durante o experimento, mas as NO apresentaram peso inferior aos outros grupos a partir do 12°mês ($P < 0,01$). Nos 60 dias que antecederam a primeira ovulação, a concentração de leptina plasmática aumentou ($P < 0,01$) no grupo P, mas não nos grupos NP e NO ($P > 0,5$), porém não houve diferença entre os grupos ($P > 0,5$). Houve correlação entre a concentração de leptina plasmática e o peso corporal nos grupos P (r=0,36; $P < 0,01$) e NP (r=0,4313; $P < 0,01$), mas não no grupo NO (r=0,095; $P > 0,5$). A concentração plasmática de IGF-I aumentou ($P < 0,01$) nos 3 grupos do 8° ao 16° mês de idade, mas foi maior no grupo P ($P < 0,01$) do que nos NP e NO, que não diferiram entre si. Antes da primeira ovulação, não foi verificado aumento ($P > 0,1$) na concentração de IGF-I em nenhum dos grupos, porém a concentração foi maior no grupo P (*P*

< 0,05). Pode-se concluir que a concentração de leptina, junto com o peso corporal foram importantes na primeira ovulação, enquanto o IGF-I, na determinação da precocidade sexual.

Palavras-chave: Puberdade. Precocidade. Leptina. IGF-I. Novilhas Nelore.

ABSTRACT

BELTRAN, M. P. **Possible effects of plasmatic leptin and IGF-I on puberty and sexual precocity of Nelore heifers *(Bos taurus indicus*).** [Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)]. 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Plasmatic leptin and IGF-I were quantified from 36 Nelore heifers, and compared to age at first ovulation and sexual precocity. For leptin quantification, a radioimmunoassay, using antibody against recombinant equine leptin inoculated in rabbit was validated. The specificity, stability, recuperation tax and matrix effect showed that the assay was able to quantify for plasmatic bovine leptin quantification. The IGF-I was quantified with a commercial Kit (DSL). Blood samples were taken every 4 days and analyzed retrospectively 60 days before first ovulation and from mensal samples from 8th to 16th month of age. Most of the heifers ovulated (83.3%) until the end of experiment, those were divided in heifers that became pregnant until the 16° month of age (33.3%), named Precocious group (P), 50% that did not became pregnant were the non precocious group (NP) 16% of the heifers did not ovulated and were named NO. There was no difference ($P > 0.05$) in the first ovulation age between P (439±27.9 days) and NP (445±36.8 days) groups. The weight of the 3 groups increased ($P < 0.01$), but did not differ ($P > 0.05$) between P and NP heifers but NO showed lower weight ($P < 0.01$) after the 12th month ($P < 0.01$). Sixty days before first ovulation, plasmatic leptin concentration increased ($P < 0.01$) in P group, but did not in NP or NO ($P > 0.5$), and there were no difference between groups. ($P > 0.5$). There was correlation between plasmatic leptin and body weight in P (r=0.36; $P < 0.01$) and NP (r=0.4313; $P < 0.01$), but did not in NO group (r=0.095; $P > 0.5$). Plasmatic IGF-I concentration increased ($P < 0.01$) in the 3 groups, from 8th to 16th month of age, but was higher in P ($P < 0.01$) than NP and NO, that did not differ among themselves. Before first ovulation there was, no increase ($P > 0.1$) in IGF-I in none of groups, but concentration was higher in P ($P < 0.05$) group. It could be concluded that leptin concentration as well as body weight were important in first ovulation, while IGF-I, in the sexual precocity determination.

Key words: Puberty. Precocity. Leptin. IGF-I. Nelore heifers.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus Celsius

μg: micrograma

μl: microlitro

I^{125}: radioisótopo do Iodo com numero de massa molecular 125

ANOVA: análise de variância

BSA: albumina sérica bovina

CPM: Contagens por minuto

CV: Coeficiente de variação

E2: estradiol

ECC: escore de condição corporal

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EPM: Erro padrão da média

ERα: receptor α estrogênico

ERβ: receptor β estrogênico

FSH: hormônio folículo estimulante

GH: somatotropina

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina

h: horas

HHG: eixo hipotálamo-hipófise-gônadas

IGF-I: fator de crescimento semelhante a insulina – tipo I

I^{125}: iodo 125

IA: Inseminação Artificial

IRMA: ensaio radioimunometrico

KDa: kilodalton

KeV: kilo-eletronvolts

Kg: kilogramas

LH: hormônio luteinizante

M: molar

MB: ligação máxima

mCi: mili-Currie

ml: mililitro

NaCl: Cloreto de sódio

NaN_3: azida sódica

ng: nanogramas

NP: grupo Não Precoces

NPY: Neuropeptídeo Y

NSB: Ligação não específica

NO: grupo Não Ovuladas

Ob: gene para leptina

Ob-R: receptor para o gene Ob

P: grupo Precoces

PB: Tampão fosfato

PBS: Tampão fosfato salina

PEG: Polietilenoglicol

PROC GLM: Análise de Variância de Medidas Repetidas do SAS

r: coeficiente de correlação

r-bLEP: leptina recombinante bovina

r-eLEP: leptina recombinante equina

RIA: Radioimunoensaio

RPM: rotações por minuto

SAS: Statistical Analisys System

SNC: sistem nervoso central

SNC: Soro Normal de Coelho

SNM: Soro Normal de Macaco

TC: Contagem total (Total Count)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 HIPÓTESES 18

3 OBJETIVOS 19

4 REVISÃO DE LITERATURA 20

4.1 PRECOCIDADE SEXUAL E SUA IMPORTÂNCIA NA PRODUÇÃO ANIMAL 20

4.2 CONTROLE ENDÓCRINO DA PUBERDADE 22

4.3 FATORES QUE INFLUENCIAM O INÍCIO DA PUBERDADE 24

4.3.1 Idade 24

4.3.2 Peso 26

4.3.3 Leptina 28

4.3.4 Fator de crescimento semelhante insulina tipo I (IGF-I) 32

4.4 RADIOIMUNOENSAIO PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS METABÓLICOS 35

4.4.1 Marcação do Hormônio com Isótopo Radioativo do Iodo^{125} – Iodação 36

4.4.2 Produção de anticorpos 37

4.4.3 Validação do RIA 38

4.4.4 Ria para leptina 40

EXPERIMENTO 1

Validação de radioimunoensaio para quantificação de leptina plasmática bovina

5 INTRODUÇÃO 42

6 MATERIAIS E MÉTODOS 43

6.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI-LEPTINA EQÜINA 43

6.1.1 Diluição da leptina recombinante 43

6.1.2 Inoculação da leptina eqüina em coelho 43

6.2 IODAÇÃO DA LEPTINA EQÜINA 44

6.3 TESTES DE LIGAÇÃO 46

6.4 DILUIÇÃO DA CURVA PADRÃO *DE r-bLEP* E *r-Elep* 46

6.5 TESTES DE VALIDAÇÃO 47

6.5.1 Protocolo para quantificação de leptina adaptado de GYULA HUSZENICZA 47

6.5.2 Teste de paralelismo 48
6.5.3 Testes de especificidade..... 48
6.5.4 Testes de estabilidade 48
6.5.5 Taxa de recuperação ou teste de exatidão..... 49
6.5.6 Teste de efeito matriz 49
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 50
8 RESULTADOS..... 51
8.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI r-*eLEP*..... 51
8.2 TESTE DE PARALELISMO..... 51
8.3 TESTES DE ESPECIFICIDADE 53
8.4 TESTES DE ESTABILIDADE 55
8.5 TAXA DE RECUPERAÇÃO OU TESTE DE EXATIDÃO 55
8.6 TESTE DE EFEITO MATRIZ..... 56
9 DISCUSSÃO 58

EXPERIMENTO 2

Possíveis efeitos da concentração de leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) do 8° ao 16° mês de idade.

10 INTRODUÇÃO 61
11 MATERIAIS E MÉTODOS..... 62
11.1 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO 62
11.2 ANIMAIS 62
11.2.1 Manejo de Inseminação Artificial (IA) 63
11.2.2 Peso 63
11.2.3 Coletas de sangue e determinação das amostras para a quantificação de leptina e IGF-I..... 63
11.3 QUANTIFICAÇÃO DA LEPTINA PLASMÁTICA BOVINA..... 64
11.4 QUANTIFICAÇÃO DO IGF-I PLASMÁTICO BOVINO 65
12 ANÀLISE ESTATÍSTICA 67
13 RESULTADOS..... 69
13.1 CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS..... 69
13.2 PESO 69
13.3 VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA LEPTINA 71

13.3.1 De acordo com a idade em meses 71
13.3.2 Variação na concentração de leptina próximo à primeira ovulação 73
13.4 CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE LEPTINA PLASMÁTICA E O PESO CORPORAL 74
13.5 VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DO IGF-I PLASMÁTICO 75
13.5.1 De acordo com a idade em meses 75
13.5.2 A cada 4 dias, 56 dias antes da primeira ovulação 77
13.6 CORRELAÇÃO ENTRE IGF-I PLASMÁTICO E PESO CORPORAL..... 78
14 DISCUSSÃO 79
15 CONCLUSOES 87
REFERÊNCIAS 88

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho comercial do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2005), e está posicionado como o maior exportador de carne bovina, graças aos índices de produtividade de algumas regiões do país, semelhantes aos de países desenvolvidos, mesmo apresentando características extrativistas em algumas regiões. Na média, a taxa de desfrute, em torno de 22% (DBO, 2005), está aquém do real potencial da atividade.

Alguns fatores interferem para esse índice, tais como a idade avançada das vacas ao primeiro parto, a baixa taxa de fertilidade, alta taxa de mortalidade dos bezerros até a desmama e o baixo ganho de peso dos animais. A melhoria nas condições de manejo, sanidade e nutrição, entre outros, possibilitaria melhoras no desempenho e índices reprodutivos do rebanho.

Para a criação sustentável e lucrativa de bovinos é necessária a compreensão dos mecanismos biológicos relacionados à reprodução animal associada às práticas de manejo que aumentam a produção. O desempenho reprodutivo é geralmente citado como a característica econômica mais importante na criação de bovinos de corte, sendo que a reprodução está associada ao desenvolvimento corporal adequado das novilhas. O tipo de manejo, nutricional e sanitário, que as novilhas recebem, exerce forte influência na reprodução, afetando a produção de bezerros.

A antecipação da idade ao primeiro parto está ligada à eficiência da lucratividade da produção de carne bovina. Aumentar a eficiência reprodutiva do gado de corte pode melhorar a produção e a oferta de proteína de origem animal. Nos países mais desenvolvidos, a indústria de produção de gado de corte empregou um manejo seletivo que faz as novilhas parirem aos dois anos de idade (WOLFE et al., 1990). Segundo Martin et al. (1992) o desempenho reprodutivo das novilhas depende da idade em que essas fêmeas parem pela primeira vez. Novilhas que parem mais cedo têm maior vida reprodutiva do que as mais tardias. Assim, novilhas que apresentam o primeiro parto próximo aos 24 meses de idade, ou seja, primeira cobertura/inseminação artificial (IA) aos 15 meses atingem a produtividade máxima (PATTERSON et al., 1992).

Até pouco tempo acreditava-se que a inibição da secreção de gonadotrofinas no período pré-puberal nos bovinos era conseqüência exclusiva do excesso de sensibilidade do

hipotálamo ao estradiol inibindo a secreção de GnRH, mecanismo conhecido como gonadostático. A forma como a taxa de crescimento, a idade ou o peso vivo mudam a sensibilidade do hipotálamo ao estradiol e ativam os mecanismos neuromoduladores indica que deve haver uma proporção crítica de gordura corporal que leva à puberdade.

O momento do início da puberdade em mamíferos está altamente relacionado AA condição nutricional e metabólica (CHEUNG et al., 1997; EHRHARDT et al., 2000). O peso do animal, em conseqüência do estado nutricional, pode explicar muitas variações associadas à primeira ovulação (GARCIA et al., 2002) entre elas a concentração de leptina circulante (CHEHAB et al., 1997; CHEUNG et al., 1997; GARCIA et al., 2002) e do IGF-I (HINEY et al., 1996.

A concentração de leptina plasmática aumenta antes da puberdade em novilhas (DIAZ-TORGA et al., 2001; GARCIA et al., 2002), assim como as concentrações plasmáticas do fator de crescimento semelhante insulina do tipo I (IGF-I), sugerindo que esses hormônios estejam envolvidos no inicio da puberdade. É necessário que se estude a associação desses hormônios com o início da puberdade em novilhas zebuínas, já que poderiam atuar como sinalizadores metabólicos para a primeira ovulação em novilhas zebuínas.

O conhecimento das relações entre a nutrição e a reprodução é fundamental na tomada de decisões, quando se pretende aumentar a eficiência produtiva de um rebanho. Além disso, permite traçar estratégias que visem aperfeiçoar programas de melhoramento genético e multiplicação animal. O melhoramento das características genotípicas e fenotípicas em bovinos, objetivando o aumento da produtividade, é de grande interesse econômico, e vem sendo alvo de grandes esforços nos últimos tempos. Sendo assim, a possibilidade de estudar e selecionar animais que apresentem características de precocidade sexual, além de melhorar o conhecimento das bases fisiológicas da maturação sexual de bovinos da raça Nelore, que apresentam a primeira ovulação mais tardia, trará uma enorme contribuição para o desenvolvimento do sistema de criação de gado de corte no país. Conhecimentos básicos permitirão a identificação de variáveis que poderão funcionar como marcadores fisiológicos ou fornecerão subsídios para a identificação de possíveis marcadores moleculares relacionados com o evento, possibilitando antecipar o processo de seleção para precocidade.

2 HIPÓTESES

1. A leptina atua como um sinalizador metabólico determinando o momento da puberdade, de acordo com a idade e condição corporal do animal.
2. As novilhas que emprenharam primeiro (aos 16 meses) possuem maior concentração de leptina plasmática ou um aumento anterior às novilhas não precoces.
3. A concentração de IGF-I atuaria como sinalizador metabólico para o início da puberdade.

3 OBJETIVOS

1. Produção de anticorpos contra leptina eqüina recombinante para utilizar na quantificação da leptina plasmática bovina.
2. Validar a técnica de radioimunoensaio para a realização de ensaios específicos para a leptina bovina.
3. Aumentar a compreensão sobre os mecanismos fisiológicos envolvendo a leptina e o IGF-I, além da idade e peso à primeira ovulação sobre a puberdade de novilhas Nelore Precoce e Não Precoces, considerando a prenhez aos 16 meses, e Não Ovuladas, no intervalo dos 8 aos 16 meses de idade.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PRECOCIDADE SEXUAL E SUA IMPORTÂNCIA NA PRODUÇÃO ANIMAL

A precocidade sexual está ligada à eficiência e à lucratividade da pecuária bovina e o desempenho reprodutivo das novilhas depende da idade ao primeiro parto. Na pecuária, as características reprodutivas têm um impacto econômico cerca de dez vezes maior do que as características associadas ao crescimento (HILL, 1998). Novilhas que parem mais cedo têm maior vida reprodutiva que as tardias, por produzir mais bezerros (MARTIN et al., 1992). Rebanhos com elevado percentual de precocidade sexual e fertilidade possuem maior disponibilidade de animais, tanto para venda como seleção, permitindo maior intensidade seletiva e conseqüentemente, progressos genéticos mais elevados e maior lucratividade (BERGMANN, 1998).

Entre as vantagens na antecipação do primeiro parto estão o menor tempo para obter retorno do investimento, aumento da vida reprodutiva da novilha e aumento do número de bezerros produzidos, assim, o desempenho reprodutivo é a característica econômica mais importante num rebanho (PATTERSON et al., 2006). A possibilidade de antecipação da idade à puberdade de três para dois anos no gado Nelore aumentaria o retorno econômico em 16% segundo Eler, et al. (2002). Teixeira (1997), ao simular três sistemas de produção para novilhas Nelore, verificou que a antecipação do primeiro parto para os 27-30 meses de idade aumentou em 45% a receita bruta da atividade.

A redução da idade ao primeiro parto, tornando o zebu mais precoce reprodutivamente é um dos maiores desafios da pecuária nacional. As novilhas do rebanho brasileiro possuem idade elevada ao primeiro parto, o que reflete em baixa lucratividade. Nos últimos 5 anos, o baixo índice de desfrute do rebanho brasileiro, entre 20-25%, é resultado principalmente da baixa idade ao primeiro parto, ao redor dos 30 meses, e baixa taxa de prenhez das matrizes, ao redor de 50-60% (ANUALPEC, 2005).

A principal característica indicadora da precocidade sexual dos bovinos é a idade à puberdade, e pode ser um importante referencial nos programas de melhoramento dos zebus (MACKINNON et al., 1990; MEYER et al., 1990; BERGMANN et al., 1996), caracterizada

pela a ovulação seguida de manifestação de estro, o que dá início à vida reprodutiva da fêmea. Segundo Macneil et al. (1984) a herdabilidade da idade à puberdade é relativamente alta (0,61) permitindo seleção através deste fenótipo. No entanto, do ponto de vista prático, no sistema de criação extensiva há dificuldade em se caracterizar a primeira ovulação para que possa ser utilizada como ferramenta para o melhoramento. A identificação da primeira ovulação nas fêmeas envolve palpações retais, avaliações ultra-sonográficas ou quantificação da progesterona circulante que muitas vezes impossibilitam sua aplicação na rotina de propriedades rurais.

A herdabilidade da data ao primeiro parto de novilhas Nelore encontrada por Gressler et al. (1998) foi de 0,11. A média das estimativas à herdabilidade para a antecipação da idade à primeira cria de fêmeas Nelore expostas ao touro aos 14 meses encontrada por Pereira et al. (2001) foi de 0,19, o que sugere a possibilidade de resposta à seleção para esse critério. Dessa forma, a antecipação da idade reprodutiva das fêmeas pode ser obtida ao selecionar as novilhas para a menor idade ao primeiro parto, uma vez que a identificação da idade à puberdade apresenta dificuldades práticas para a aplicação em criações extensivas (BERGMANN, 1993). Um fator limitante na utilização da idade ao primeiro parto como critério de seleção para precocidade sexual é o tempo demandado, de dois ou três anos, para a expressão desta característica. A possibilidade da identificação de variáveis fisiológicas em novilhas pré-púberes relacionadas à fertilidade precoce permitirá antecipar o processo de seleção das novilhas com potencial para precocidade diminuindo o intervalo entre a observação do evento e seleção. Os conhecimentos poderão ser gerados através de uma pesquisa integrando de forma multidisciplinar a fisiologia, normalmente geradora de conhecimentos básicos à zootecnia, com maior vocação tecnológica.

Assim, para que se possa garantir a lucratividade dos rebanhos é necessário diminuir o intervalo entre partos e elevar a taxa de prenhez. A diminuição da idade ao primeiro parto aumenta a produção, antecipa a recuperação do investimento, aumenta a vida produtiva além de permitir a seleção mais rápida nas fêmeas por reduzir o intervalo entre gerações (MATTOS; ROSA, 1984).

A eficiência reprodutiva pode ser considerada como uma das mais importantes características econômicas, merecendo atenção dos criadores de gado de corte. Rebanhos detentores de elevada precocidade sexual e fertilidade possuem maior disponibilidade de animais, tanto para a venda como para seleção, permitindo maior intensidade seletiva e,

conseqüentemente, progressos genéticos mais elevados e maior lucratividade (MEACHAM; NOTTER, 1987; FONSECA, 1991).

4.2 CONTROLE ENDÓCRINO DA PUBERDADE

A entrada na puberdade é caracterizada pela primeira ovulação (RAWLINGS et al., 2003) acompanhada pelo desenvolvimento de um corpo lúteo capaz de se manter durante um ciclo estral completo (KINDER et al., 1987), e deve ocorrer entre 6 e 24 meses de idade, dependendo de fatores genéticos e ambientais (MORAN et al., 1989). Esse processo exige muito gasto de energia e nutrientes, já que precisa garantir a manutenção e o crescimento de um novo indivíduo, no caso de uma gestação, além de preparar a glândula mamária para produzir leite, garantindo a sobrevivência do bezerro.

Após o nascimento, vários mecanismos evitam a ativação do sistema endócrino reprodutivo antes do tempo, permitindo a continuidade do crescimento e desenvolvimento do animal até que ele alcance cerca de 65-70% do peso adulto, o que representa um desenvolvimento somático compatível com a reprodução, possibilitando a partir desse momento, o gasto energético com gestação, parto e lactação (PATTERSON et al., 1992; SEMMELMAN et al., 2001).

Bezerras de 1 a 3 meses de idade possuem o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG) funcionalmente maduro (BARNES et al., 1980; NAKADA et al., 2002), sendo capazes de desenvolver uma cascata de eventos endócrinos que induzem ao estro. Entretanto, a alta sensibilidade do hipotálamo ao estradiol leva à inibição da atividade reprodutiva (DAY et al., 1987; SCHILLO 2003).

Durante a maturação hipotalâmica da novilha os tipos de receptores para estradiol no hipotálamo, α estrogênicos (ERα) e β estrogênicos (ERβ), podem se alterar. Aparentemente o ERα é mais importante para estimular a secreção de gonadotrofinas que o ERβ. Animais que não expressam o ERα são inférteis enquanto que a falta dos ERβ tornam as fêmeas sub-férteis (COUSE; KORACH, 1999). Outra possível explicação para o aumento na secreção de LH durante a maturação sexual na novilha seria a mudança na quantidade de receptores de estradiol em diferentes áreas do hipotálamo (NETT et al., 2002; LOOPER et al., 2003). Foi demonstrado na ovelha que o estradiol age no hipotálamo médio-basal estimulando a secreção

de GnRH e na área pré-óptica medial, inibindo a secreção de LH (CARATY et al., 1998). Assim, se a quantidade de receptores de estradiol aumentar no hipotálamo médio basal e diminuir na área pré-óptica medial, o hipotálamo passaria a responder positivamente ao estradiol, ao invés de negativamente. No entanto, trabalhos anteriores detectaram diminuição do número de receptores para estradiol tanto no hipotálamo anterior quanto no médio basal e hipófise durante a maturação sexual na novilha (DAY et al., 1987)

Assim, o estradiol, importante fator na regulação do eixo HHG é provavelmente o responsável primário pela indução do pico pré-ovulatório de gonadotrofinas (NETT et al., 2002), através do aumento na sensibilidade da hipófise anterior ao GnRH, que causa o pico pré-ovulatório de LH (PETERSEN et al., 2003). Portanto, baixas concentrações de estradiol exercem efeito de *feed-back* negativo na liberação tônica de LH (SCHILLO et al., 1992).

O estradiol influencia a atividade dos neurotransmissores e neuropeptídeos que afetam a secreção de GnRH no cérebro (SMITH, JENES, 2001). Esses neurotransmissores e neuropeptídeos tais como o neuropeptídeo Y (NPY), exercem tanto ação estimulatória quanto inibitória na regulação do funcionamento neuronal do GnRH pela ligação e ativação a receptores de membrana específicos que são expressos nos neurônios de GnRH. Smith e Jenes (2001) sugeriram que o estradiol comanda a secreção do GnRH por ligar o sinal neuronal circadiano do núcleo supraquiasmático aos neurotransmissores e neuropeptídeos que regulam a secreção de GnRH.

Alguns trabalhos têm mostrado que uma diminuição nas concentrações de progesterona, juntamente ao aumento no estradiol, influenciam no aumento da sensibilidade hipofisária antes da ovulação mas não existem evidências de que atue diretamente sobre a hipófise, mas sim de que regule a freqüência do GnRH devido mecanismos indiretos e cause uma "*up-regulation*" nos receptores de GnRH (VIZCARRA et al., 1997; NETT et al., 2002). Assim que a puberdade se aproxima, o *feed-back* negativo sobre a secreção de LH diminui e os pulsos ou a freqüência da liberação de LH aumenta drasticamente durante as últimas semanas antes da puberdade. (SCHILLO et al., 1982; DAY et al., 1984; 1987; RODRIGUES et al., 2002) resultando no aumento das concentrações circulantes de LH (HONAMAROOZ et al., 1999). Esse aumento na freqüência dos pulsos do LH tem sido apontado como um pré-requisito para o início da puberdade em novilhas, evidente especialmente durante os primeiros 50 dias que precedem à puberdade (DAY et al., 1984; 1987; KINDER et al., 1987; MORAN et al., 1989; EVANS et al., 1994; ANDERSON et al., 1996). Day et al. (1984) demonstraram que o *feed-back* negativo do estradiol sobre a secreção de LH diminui a medida que a puberdade se aproxima.

A freqüência na pulsatilidade do LH pode ser melhor indicador do momento da puberdade do que seus valores médios (DAY et al., 1984; KINDER et al., 1987) e o aumento na freqüência dos pulsos podem estimular o crescimento folicular e a síntese dos hormônios esteróides nos ovários. Adicionalmente, o aumento pré-púbere no LH pode resultar de uma diminuição na habilidade do estradiol em inibir a secreção de GnRH do hipotálamo e de uma diminuição no *feed-back* negativo do estradiol diretamente na hipófise de maneira que a responsividade da hipófise ao GnRH aumente durante o período peri-púbere. Quando o feed-back negativo do estradiol é superado pelo aumento no LH, a produção de estradiol folicular aumenta, o que irá ocasionar o primeiro pico pré-ovulatório de LH e conseqüentemente a ovulação, podendo caracterizar a entrada na puberdade.

4.3 FATORES QUE INFLUENCIAM O INÍCIO DA PUBERDADE

4.3.1 Idade

Um dos principais fatores envolvidos no início da puberdade é a idade. As relações entre idade ao primeiro parto e o início da ovulação são fatores que podem determinar a precocidade sexual. A idade à puberdade para novilhas zebuínas, normalmente mais tardias, varia em torno de 22 a 36 meses (SOUZA et al., 1995; ROMANO, 1997, RESTLE et al.,1999) e a idade ao primeiro parto, entre 44 a 48 meses (MUKASA MUGERWA, 1989; ; SOUZA et al., 1995; RODRIGUES et al., 2002), indicando a necessidade de maiores informações sobre os mecanismos endócrinos envolvidos no início da puberdade dos zebuínos (GALINA et al., 1989). Em raças taurinas, a primeira ovulação ocorre entre 7 e 12 meses, com primeira cobertura em torno de 15 meses e primeiro parto entre 24 e 36 meses (DOBSON; KAMONPATANA, 1986).

Embora exista a necessidade de uma idade mínima para a primeira ovulação na novilha, fatores genéticos e ambientais também influenciam a idade à puberdade (PATTERSON, et al. 1992; ROCHA; LOBATO, 2002).

Em novilhas Nelore, encontramos diferentes idades à primeira concepção, sugerindo a possibilidade de variação genética entre elas quanto à apresentação desta característica (MILAZOTTO et al., 2002). Algumas pesquisas vêm sendo feitas buscando referências que

possam antecipar o processo de melhoramento genético com relação a esse aspecto (LOBO et al., 2001) uma vez que a diminuição da idade à puberdade é um importante critério no aumento da produtividade da raça, mas o tempo para observação do fenótipo é demorado.

A primeira ovulação aos 15 meses foi utilizada como referência e considera que com o primeiro parto ocorrendo aos dois anos de idade ao invés de três anos, haverá um aumento de 16% no retorno econômico do sistema de criação de gado de corte. Foi demonstrado recentemente que a baixa pressão de seleção imposta às novilhas Nelore buscando diminuir a idade a puberdade resultou em um fenótipo com alta variabilidade e alta herdabilidade, permitindo que a seleção dos animais quanto a apresentação deste critério possua resultados práticos e significativos (ELER et al., 2002). Meirelles (2004), trabalhando com fêmeas da raça Nelore, obteve estimativa média de herdabilidade para a probabilidade de prenhez precoce igual a 0,32 ± 0,01 e Pereira et al. (2001) e Eler et al. (2002) consideraram que a utilização da idade à primeira prenhez de novilhas, como critério de seleção, tem apresentado boas estimativas de herdabilidade.

A seleção direta para algumas características pode ser feita através de variáveis reprodutivas facilmente mensuraveis desde que possuam variabilidade e tenham correlação genética com os eventos reprodutivos. A impossibilidade da identificação da primeira ovulação torna a idade ao primeiro parto, uma variável de fácil acompanhamento, uma boa indicativa do início da atividade reprodutiva das fêmeas (PONZONI, 1992).

Nos sistemas de produção de bovinos de corte, a importância da idade das novilhas ao primeiro parto reside na redução do intervalo de gerações, na capacidade de afetar o progresso genético do rebanho, no peso e número de bezerros comercializáveis (ROCHA; LOBATO, 2002).

A idade ao primeiro parto pode ser considerada como característica indicadora do início da atividade reprodutiva das fêmeas. A redução da idade ao primeiro parto, conseqüente ao aumento da precocidade sexual dos animais, parece ser o maior desafio do zebu brasileiro. Face às dificuldades operacionais para implementação de programas de seleção para a idade à puberdade, torna-se importante a utilização de características indicadoras de precocidade sexual, que tenham variabilidade genética adequada, que sejam de mensuração fácil e econômica, e que tenham correlação genética favorável com idade à puberdade e outras características economicamente importantes (BERGMANN, 1998).

4.3.2 Peso

Existe uma associação importante entre a nutrição e o sistema reprodutivo (KEISLER; LUCY, 1996), sendo que a condição nutricional inadequada durante o período pré-púbere atrasa a puberdade (DAY et al., 1986; CHEUNG et al., 1997; GARCIA et al., 2002), comprometendo o amadurecimento do sistema endócrino reprodutivo (DAY et al., 1986).

Sabe-se que o início da puberdade e a manutenção da função reprodutiva estão fisiologicamente ligados à nutrição e à condição corporal. Sinais metabólicos referentes à nutrição e à condição corporal são recebidos e processados pelo cérebro comprometendo a liberação de GnRH (EBLING et al., 1990) e dando início à maturação sexual somente quando as reservas de energia estão adequadas para suprir as demandas da gestação e lactação (WADE; SCHNEIDER, 1992). Em situação de restrição alimentar, observou-se redução na freqüência de pulsos de LH, causado por fatores como insulina, IGF-I, glicose (SCHILLO 1992). Para que as novilhas possam atingir a maturação sexual mais cedo, necessitam de nutrição adequada e a restrição alimentar pode diminuir a freqüência dos pulsos de LH, atrasando assim a entrada na puberdade, sendo que o restabelecimento do balanço energético positivo poderia estimulá-la (YELICH et al., 1996; WILLIAMS, 1998).

De acordo com o NRC (1996) os valores em que as novilhas se apresentariam aptas para atingir a puberdade seriam 55, 60 e 65% do peso adulto para as raças *Bos taurus* de dupla aptidão, *Bos taurus* e *Bos indicus* respectivamente. Dobson; Kamonpatana, 1986 relataram peso mínimo de 250 a 300 kg para o início da vida reprodutiva das novilhas taurinas, para zebuínos a puberdade deve acontecer quando atingirem entre 65 e 70% do peso adulto, que corresponde ao redor de 300 a 330 kg (PATTERSON et al., 1992; CARRIJO; DUARTE, 1999; THALLMAN et al.,1999; SEMMELMANN et al., 2001). Pesos inferiores no início da estação de monta irão comprometer o desempenho reprodutivo desses animais, afetar o peso ao parto e trazer conseqüências negativas ao desempenho animal na primeira lactação e à fertilidade na estação de monta subseqüente (WILTBANK et al., 1985). Problemas nutricionais podem atrasar a primeira ovulação e melhoras na nutrição estimulariam o crescimento corporal, antecipando a maturação sexual.

Por outro lado, como a puberdade ocorre após a novilha atingir de 65-70% do peso adulto (SEMMELMANN et al., 2001), existe o conceito de que animais mais pesados necessitariam de maior energia de manutenção e atingiriam a puberdade mais tarde que

animais mais leves, portanto o aumento de massa pode ser uma característica indesejável para um rebanho em reprodução (OWENS et al., 1993). Existe a recomendação para vacas nelore de menor porte, que além de possuírem uma menor exigência nutricional entram mais cedo na puberdade (VALE et al., 1998). Mercadante et al. (2003) estudando novilhas Nelore selecionadas para alto peso corporal constataram que esses animais não apresentaram prejuízo no desempenho reprodutivo, recomendando esses critério de seleção para a raça.

O ganho de peso da desmama à puberdade é um importante referencial. Alencar et al. (1987) observaram que as novilhas Nelore que apresentaram maior peso aos 12 e 18 meses possuíam menor idade ao primeiro cio. A restrição alimentar aos 8 meses de idade aumentou a idade e diminuiu o peso à puberdade (BERGFELD et al.,1994).

Novilhas com menor ganho de peso diário tiveram peso similar, mas foram muito mais tardias que suas contemporâneas com maior ganho de peso ao início da puberdade (SHORT; BELOWS, 1997). Kinder et al. (1995) mantiveram novilhas de 14 meses de idade e peso adequado em estágio pré-pubere através da restrição de alimentos e induziram a ovulação repentinamente e de maneira sincronizada através do aumento no consumo nutricional.

A condição corporal no pré-parto em novilhas primíparas influência a resposta na ingestão de nutrientes no pós-parto. Quando vacas com escore de condição corporal (ECC) igual a 6 foram alimentadas no pós-parto para ganhos de peso de 0,44 ou 0,85 kg por dia, a percentagem de vacas em cio nos primeiros 20 dias da estação de monta aumentou de 40 para 85%. Entretanto quando as vacas apresentaram ECC 4, o maior ganho de peso diário somente aumentou a porcentagem de vacas em cio de 33 para 50% (SPITZER et al., 1995).

O excesso de peso também pode ser prejudicial ao desempenho reprodutivo. Novilhas com peso adequado antes do tempo para reprodução apresentam dificuldades reprodutivas, já que a composição corpórea, assim como a dieta, interferem no desenvolvimento pós fertilização dos oócitos, comprometendo a qualidade embrionária e a taxa de concepção, alem do que a alimentação em excesso pode tornar os animais hiperinsulinêmicos (ADAMIAK et al., 2005).

Uma questão interessante é a de como o sistema nervoso central (SNC) reconhece que o corpo chegou ao peso adequado para a reprodução. Um dos responsáveis por essa sinalização é a leptina, um hormônio produzido pelos adipócitos que estimula a secreção de IGF-I além de aumentar a disponibilidade de glicose para o SNC (FOSTER; NAGATANI, 1999).

4.3.3 Leptina

A leptina, o produto do gene OB, é um hormônio produzido principalmente pelos adipócitos (ZHANG, et al., 1994; FLIER, 1997; FRIEDMAN; HALAAS, 1998; HOUSENKNECHT; PORTOCARRERO, 1998) que age sobre o sistema nervoso central sinalizando sobre o estado nutricional, e assim regulando o consumo alimentar e o balanço energético (CAMPFIELD et al., 1995; FRIEDMAN; HALAAS, 1998; EHRHARDT et al., 2000). É uma proteína de 146 aminoácidos e 16 KDa com estrutura terciária semelhante às citocinas (ZHANG et al., 1994).

Além de ser expressa no tecido adiposo branco (CHILLIARD et al., 2001), a leptina é expressa em outros tecidos, como hipotálamo (MORASH et al., 1999), hipófise (JIN et al., 2000; YONEKURA et al., 2003), sinciciotrofoblasto (MASUZAKI et al., 1997), tecidos fetais (EHRHARDT et al., 2002; YUEN et al., 2002), glândula mamária (CHELIKANI et al;, 2003; LEURY et al. 2003), epitélio gástrico (BADO et al., 1998) e musculatura esquelética (WANG et al., 1998).

Os níveis de leptina circulantes estão diretamente relacionados com a quantidade de RNAm para leptina no tecido adiposo (MAFFEI et al., 1995), e sua concentração pode variar de acordo com a distribuição de gordura, que é diferente entre as raças, o que pode refletir na quantidade de leptina produzida (DELAVAUD et al., 2002). Já foram relatadas diferenças nas concentrações de leptina entre animais de corte e leite (BLOCK et al., 2001; DELAVAUD et al., 2002), detectando em animais com semelhante escore de condição corporal (ECC), em torno de 3,5, concentrações de leptina de 6,6 ng/ml na raça Charolesa, enquanto na Holandesa, foi detectado o dobro, 13,7 ng/ml (DELAVAUD et al., 2002).

Em humanos e roedores os efeitos da leptina parecem ser modulados pela presença da leptina circulante na forma livre, mais ativa, mas co menor meia vida, e na forma ligada a uma proteína transportadora, menos ativa, mas possui meia vida maior (SINHA et al., 1996; HILL et al.,1998). Em ruminantes, parece não haver tal proteína transportadora para leptina no plasma (GARCIA et al., 2002; LEURY et al., 2003), entretanto outro estudo (CROUCH; SMITH, 2004) sugeriu que exista uma forma solúvel do receptor para leptina presente no plasma e que mude de acordo com o peso e o ciclo prenhez-lactação.

A leptina atinge o SNC possivelmente através da barreira hemato-cefálica ou através do fluido cérebro-espinhal, entretanto é improvável que o fluido cérebro espinhal seja a

principal fonte de leptina atuante no cérebro já que nele a concentração de leptina chega a ser quase 100 vezes menor que no plasma (TARTAGLIA et al., 1995)

Receptores de leptina (Ob-R) estão presentes em regiões hipotalâmicas envolvidas na regulação do comportamento alimentar, reprodução e crescimento, como o núcleo arqueado e ventromedial (ZAMORANO et al., 1997), aonde estão co-expressos com neuropeptídeos reguladores da expressão de leptina, tais como o NPY e proopiomelanocortina (POMC) (ELMQUIST et al., 1998). Já foram identificados receptores ERα co-localizados nos neurônios do Ob-R no hipotálamo de ratas (DIANO et al., 1998), sugerindo que o estrógeno pode regular os níveis hipotalâmicos do Ob-R.

Já foram identificados receptores para leptina também nas células gonadotrópicas da hipófise anterior (JIN et al., 2000), células da granulosa, da teca, e células intersticiais do ovário (KARLSON et al., 1997) e endométrio (KITAWAKI et al., 2000). A expressão multifocal da leptina, assim como a densa presença de seus receptores em todos os níveis do eixo HHG, implica que a relação leptina/nutrição regulando a reprodução envolveria complexas interações em vários níveis, na regulação do eixo HHG.

Blache et al. (2000), ao analisarem a concentração de leptina no plasma e no fluido cérebro-espinhal, concluíram que em ovinos a produção de leptina está relacionada com a massa de tecido adiposo e que o hormônio atinge a circulação, o fluido cérebro-espinhal e depois os sítios hipotalâmicos, aonde vai controlar o apetite e a secreção de GnRH. Essa resposta parece envolver alguns nutrientes e hormônios metabólicos, assim como a insulina (HÖTZEL et al., 1995, MILLER et al., 1995, 1998; BOUKHLIQ; MARTIN 1997).

No SNC, a ativação dos receptores para leptina inibe o consumo alimentar, ativa o gasto energético e afeta alguns processos metabólicos. Deste modo, como sinal adipocitário, a leptina participa no controle a médio/longo prazo do balanço energético (HAVEL, 2004). Além do mais, a leptina atua diretamente sobre os tecidos periféricos, estimulando a lipólise e inibindo a lipogênese no tecido adiposo branco, aumentando a sensibilidade à insulina e a utilização da glicose nos músculos, aumentando a oxidação de ácidos graxos nos músculos, fígado e tecido adiposo branco (UNGER, 2003).

Um dos principais papéis da leptina parece ser auxiliar os animais a se adaptarem a períodos de subnutrição. A rápida diminuição na concentração de leptina em animais subalimentados pode ser um sinal para estimular a re-alimentação e a secreção de glicocorticóides, diminuição da atividade tireoideana, gasto de energia, sensibilidade à insulina e síntese de proteínas além de bloquear a reprodução (AHIMA et al., 1996; GUI et al., 2003).

A regulação de leptina pela nutrição é mediada em parte pela insulina. A expressão de leptina aumenta após um pico na secreção de insulina durante a alimentação (SALADIN et al., 1995). A insulina estimula a expressão da leptina diretamente nos adipócitos (RENTSCH; CHIESI, 1996) e aumenta as concentrações de leptina quando injetada em roedores (SALADIN et al., 1995), assim parece haver uma relação diretamente proporcional entre as concentrações desses hormônios.

Baixas concentrações de leptina atuariam sobre o SNC de maneira a estimular o consumo de alimentos, o armazenamento e a dissipação de energia além de coordenar o metabolismo durante períodos de nutrição comprometida (FLIER, 1997; FRIEDMAN; HALAAS, 1998; HOUSENKNECHT; PORTOCARRERO, 1998).

Alguns estudos (BARASH et al., 1996; CHEUNG et al., 1997; GARCIA et al., 2002; WILLIAMS et al., 2002) relacionaram a concentração de leptina com o início da puberdade, acreditando que esse hormônio seria um provável sinal metabólico que comunicaria o estado nutricional à reprodução. Segundo Halaas et al. (1995) a leptina é sintetizada e secretada em resposta ao aumento do metabolismo. Assim, os efeitos da leptina sobre a reprodução são conseqüência da disponibilidade de reservas energéticas, já que a leptina atuaria enviando sinais a regiões do cérebro sensíveis à glicose, que influenciariam a secreção de GnRH (BRONSON, et al., 1991; FORS et al., 1999, 2002; AMSTALDEN et al., 2000; LIN, et al., 2001).

A restrição alimentar por dois dias em novilhas, próximas ao momento da puberdade, levou à diminuição da expressão da leptina no tecido adiposo, assim como da sua concentração sérica, além de reduzir o número de pulsos de LH (AMSTALDEN et al., 2000). Ao correlacionarem a expressão do RNAm para leptina no tecido adiposo e as concentrações séricas de leptina durante o desenvolvimento da puberdade com o peso e a gordura corporal (GARCIA et al., 2002), verificou-se que o peso, causador da maioria das variações associadas ao início da puberdade, se correlacionou fortemente com a concentração circulante de leptina.

O peso do animal pode explicar uma série de variações associadas ao início da puberdade (GARCIA et al., 2002), tendo correlação com a concentração de leptina circulante (R=0,83; EHRHARDT et al., 2000). Concentrações séricas de leptina aumentaram cerca de duas semanas antes da primeira ovulação, que marcou o início da puberdade em novilhas (DIAZ-TORGA et al., 2001; GARCIA et al., 2002). Ehrhardt et al., (2000), ao realizarem radioimunoensaio (RIA) específico para a quantificação de leptina bovina observaram concentração elevada de leptina em bezerros na fase de crescimento alimentados

adequadamente, e encontraram relação positiva entre a concentração de leptina plasmática e a massa gorda corporal.

A leptina pode agir de maneira direta sobre as gônadas, provocando aumento na produção de esteróides sexuais, evidenciado pelo aumento do peso do útero, em função da proliferação das glândulas, epitélio e endométrio uterino, e de maneira indireta, através da sua ação sobre o eixo hipotálamo-hipófise, aonde atuaria informando sobre o estado nutricional do animal, permitindo que o processo reprodutivo vá em frente na presença de reservas energéticas disponíveis, caso contrário, a reprodução é bloqueada (BARASH et al., 1996). O efeito estimulatório da leptina sobre a secreção de LH em ruminantes ocorre predominantemente em períodos de stress nutricional (AMASTALDEN et al., 2000; NAGATANI, et al., 2000; HENRY et al., 2001; MACIEL et al., 2004a).

Os efeitos indiretos da leptina sobre a secreção de gonadotrofinas parecem ser mediados parcialmente pelo NPY, que inibiria a secreção de LH (McSHANE et al., 1992; LEBRETHON et al., 2000). O NPY, sintetizado e localizado no núcleo arqueado e eminência média, áreas onde os neurônios NPY encontram os neurônios de GnRH, é considerado como sendo mediador primário da ação da leptina no hipotálamo por estimular a liberação basal e cíclica de GnRH e correlacionar-se com as mudanças associadas a liberação de LH induzida pelo GnRH. Concentrações circulantes de esteróides gonadais aumentam a responsividade do GnRH hipotalâmico e do LH hipofisário ao NPY (KALRA, 1993).

A restrição alimentar resulta na rápida diminuição no LH, enquanto o NPY é aumentado nas áreas reprodutivas e orexigênicas do hipotálamo. A subnutrição crônica atrasa o início da puberdade, causa estros irregulares e suprime a função hipotalâmica-gonadal (KALRA; KALRA, 1996).

Os efeitos estimulatórios da leptina sobre a secreção de LH estão restritos aos períodos de estresse nutricional (AMASTALDEN et al., 2000; NAGATANI, et al., 2000; HENRY et al., 2001; MACIEL et al., 2004a). Foi observado que o tratamento com leptina não afetou a secreção de LH em ovelhas (HENRY et al., 1999) nem em vacas (AMSTALDEN et al., 2002) ovariectomizadas e alimentadas adequadamente, mas preveniu claramente a redução na freqüência de pulsos de LH em novilhas pré-púberes sob restrição alimentar (MACIEL et al., 2004a).

A restrição alimentar foi capaz de diminuir a síntese de leptina no tecido adiposo e conseqüentemente a concentração na circulação em novilhas pré-púberes. Este efeito ocorreu paralelamente à redução na concentração de IGF-I circulante (fator de crescimento primário

envolvido no desenvolvimento somático), e à diminuição na freqüência de LH (FOSTER, et al., 1985; AMSTALDEN et al., 2000; HENRY et al., 2000; MORRISON et al., 2001).

Em camundongos (CHEHAB et al., 1997) e ratos (CHEUNG et al., 1997) geneticamente normais a administração de leptina antecipou o início da puberdade. Também em camundongos (MIZUNO et al., 1996) e ratos (LI et al., 1998) a síntese e secreção de leptina foram fortemente responsivas às mudanças no estado nutricional. Delavaud et al. (2000) detectaram reduções significativas na concentração de leptina circulante em novilhas submetidas a jejum por 48 horas. Em mulheres, a secreção de leptina parece ser episódica e sincronizada com a liberação pulsátil do LH (LICINIO et al., 1998).

Enquanto trabalhos anteriores acreditavam que a leptina seria a responsável pela entrada na puberdade em roedores (AHIMA et al., 1997; CHEHAB et al., 1997), atualmente não existem evidências que suportem essa hipótese em novilhas, já que nem o tratamento crônico de novilhas normalmente alimentadas (MACIEL et al., 2004b) nem o tratamento agudo de novilhas, ou crescendo normalmente, ou com restrição no crescimento (ZIEBA et a., 2004) foram capazes de acelerar o desenvolvimento de um modelo sexualmente maduro de secreção de gonadotrofinas.

Trabalhos recentes evidenciaram que a leptina não é o fator desencadeante da puberdade e sim um fator passivo, que permite a ocorrência da puberdade quando a maturação sexual é atingida, servindo como um sinalizador metabólico que pode regular a secreção de gonadotrofinas em resposta tanto à crônica quanto à aguda restrição energética (ZIEBA et al., 2004).

Assim, tanto a maturação sexual quanto o status nutricional são importantes na determinação de como a leptina afeta o eixo hipotálamo-hipófise em ruminantes (AMSTALDEN et al., 2002, 2003; ZIEBA et al., 2003).

4.3.4 Fator de crescimento semelhante insulina tipo I (IGF-I)

Nos mamíferos, a entrada na puberdade depende de uma série de eventos complexos que ocorrem no SNC. Sabe-se que o início e o progresso da puberdade pode ser influenciado por sinais metabólicos, como o IGF-I, uma molécula bioativa cujos níveis circulantes aumentam durante a puberdade (ROBERTS et al., 1990; HINEY et al., 1991; JONES et al., 1991; CLEMMONS, 1997) e que podem influenciar fatores hipotalâmicos, hipofisários e

gonadais, envolvidos na maturação sexual (KANEMATSU et al., 1991; PONS; TORRES-ALEMAN, 1993).

O IGF-I pode regular o eixo HHG por meio de suas ações na hipófise (KANEMATSU et al, 1991; HINEY et al., 2004) através de seus efeitos sobre os gonadotrofos hipofisários. (ADAM et al., 1998; HINEY et al., 2004), via ações endócrinas, transportadas do cérebro via circulação porta-capilar, ou via circulação geral após ser liberada pelo fígado (LACKEY et al., 1999). Relações entre IGF-I e função ovariana (SPICER; ECHTEMKAMP, 1995; CAMPBELL, 1999) e entre GH e IGF-I foram documentadas em ovelhas (THOMAS et al., 2000) sendo considerados fatores de grande importância na precocidade sexual desses animais. Foi relatada a presença de IGF-I e de seus receptores no ovário, onde constituem parte do sistema de sinalização e regulação intra-ovariana (ADASHI et al., 1985). Estudos *in vitro* demonstraram que o IGF-I aumentaria o estímulo das células da granulosa e atuaria juntamente ao FSH no estimulo da secreção de progesterona pelas células da granulosa cultivadas (ADASHI et al., 1986). Entretanto, esteróides sexuais são os principais reguladores da produção local do IGF-I no sistema reprodutivo.

O IGF-I pode ser um dos sinais que ligariam o desenvolvimento do eixo somatotrópico à ativação do sistema GnRH/LH durante a puberdade das fêmeas (HINEY et al., 1991, 1996), sendo que seus efeitos seriam modulados por níveis de esteróides gonadais (DUENAS et al., 1996), exercendo ação bifásica na liberação de gonadotrofinas. Reciprocamente, o IGF-I regula a expressão e função de receptores estrogênicos. Tal interação quer aditiva, quer sinérgica, entre IGF-I e estrógenos é vista a nível hipotalâmico (PONS; TORRES-ALEMAN, 1993). Aumentos dose-dependente no IGF-I foram observados em animais ovariectomizados, tratados com estradiol, enquanto a progesterona inibiu o efeito estimulatório do estradiol. (PONS; TORRES-ALEMAN, 1993). Além do mais, como mostrado por Duenas et al. (1996), a coativação do receptor da IGF-I e do receptor do estradiol é necessária para os efeitos do IGF-I e do estradiol no hipotálamo.

O aumento no IGF-I plasmático no momento de elevada atividade hipotalâmica-hipofisária-gonadal, particularmente no dia do primeiro pró-estro, sugere que o IGF-I contribuiu para o processo puberal (HINEY.et al., 1996).

Elevados níveis de IGF-I foram encontrados na eminência média onde o GnRH é liberado (HINEY et al., 1991), modulando tanto a expressão quanto a liberação do GnRH (ANDERSON et al., 1999).

Alguns estudos *in vitro* demonstraram que o IGF-I induziu a um aumento na liberação do LH estimulado pelo GnRH em culturas de células hipofisárias (KANEMATSU et al.,

1991; SOLDANI et al., 1995). O IGF-I é expresso no núcleo arqueado e na eminência media, áreas onde os neuroterminais do GnRH atravessam para regular a secreção de gonadotrofinas hipofisárias (LESNIAK et al., 1988), sendo provável que esta região seja o local de ação primário para o IGF-I periférico ativar a secreção de GnRH/LH na puberdade. Foi observado aumento na secreção de LH com conseqüente antecipação no início da puberdade em ratas pré-puberes que receberam infusão de IGF-I no terceiro ventrículo (HINEY et al., 1996).

Foi testada a hipótese de que hormônios metabólicos, assim como sinais nutricionais, teriam efeitos diretos sobre os ovários, baseado no princípio de que a concentração dos hormônios metabólicos, como o IGF-I, estariam associadas com alterações induzidas por alteração no balanço energético e protéico (PELL; BATES, 1990). Hormônios metabólicos atuando sozinhos ou juntamente com gonadotrofinas afetariam diretamente os folículos ovarianos de roedores *in vitro* (HSUEH et al., 1984).

Condições metabólicas desfavoráveis podem diminuir a concentração de IGF-I e a secreção de LH e assim, contribuir para o atraso na puberdade (GLASS et al., 1976; MERRY; HOLEHAN, 1979; BRONSON, 1986; RICHARDS et al.,1991; SRIVASTAVA et al., 1995). O fato do IGF-I agir diretamente no hipotálamo de animais imaturos afetando a atividade do GnRH foi inicialmente mostrada em trabalhos *in vitro* nos quais o IGF-I estimulou a liberação de GnRH da eminência média em ratos (HINEY et al., 1991), uma das regiões do cérebro com a maior concentração de receptores para IGF-I (IGF-IR) (AGUADO et al., 1989; BOHANNON et al., 1986; LESNIAK et al., 1988; WERTHER et al., 1989). Outros experimentos *in vitro*, utilizando explantes de hipotálamo demonstraram que o IGF-I também pode ter efeitos inibitórios sobre o GnRH (BOURGUIGNON et al., 1993).

A concentração de IGF-I aumentou na circulação periférica de novilhas próximo à puberdade quando submetidas ao ganho de 1,36 kg/dia em comparação àquelas alimentadas para ganhar 0,23kg/dia, que tiveram menores concentrações séricas de IGF-I e atrasaram a entrada na puberdade (YELICH et al., 1996). Schoppee et al. (1996) também encontraram aumento na concentração de IGF-I plasmático em novilhas peri-púberes alimentadas adequadamente, explicando a maior incidência de ciclos estrais nesses animais.

Concentrações circulantes de IGF-I e de insulina diminuíram consideravelmente em ovelhas e vacas durante a restrição alimentar (AMSTALDEN et al., 2000; SPICER et al., 1992). Apesar da leptina aparentemente não exercer efeito sobre as concentrações circulantes de IGF-I no gado (AMSTALDEN et al., 2002; 2003; MACIEL et al., 2004a), tanto as infusões de leptina intra-cérebro ventricular (AMSTALDEN et al., 2002) quanto as periféricas (ZIEBA et al., 2003) estimularam o aumento na concentração de insulina

circulante, e esses efeitos se mostraram dose-dependentes (ZIEBA et al., 2003). A presença de receptores para leptina nas ilhotas pancreáticas (EMILSSON et al., 1997) indica que a leptina pode regular diretamente a secreção de insulina. Em vacas, um aumento nas concentrações circulantes de leptina age como um sinal para normalizar a secreção de insulina pancreática após a restrição nutricional.

Em situações de restrição alimentar verifica-se aumento no NPY, e a sua administração de forma crônica inibe a maturação sexual e diminui o peso ovariano e responsividade a gonadotrofinas. Sob essa condição, o NPY também inibe potencialmente a produção de GH e IGF-I (KALRA; KALRA, 1996). No entanto, a leptina parece ser capaz de restabelecer a secreção de LH e suprimir a expressão de NPY em resposta ao jejum (AHIMA et al., 1996).

O fígado produz IGF-I em resposta ao estímulo do GH, e em situações de restrição alimentar, foi observada diminuição nas concentrações circulantes de IGF-I, mesmo com elevadas concentrações de GH. Esta falha na resposta hepática é causada pela redução na concentração de insulina, que leva a uma diminuição na concentração de IGF-I (THISSEN et al., 1994). Após restabelecer a alimentação adequada, a produção de IGF-I aumenta devido ao aumento na sensibilidade do receptor de GH em resposta a ação do aumento da insulina (PAO et al., 1993), já que IGF-I e insulina estão fisiologicamente unidas e ambos aumentam de acordo com o aumento da condição corporal e peso do animal. O controle individual de cada hormônio pode variar de acordo com o status metabólico e a direção das mudanças no peso. Por fim, quando os animais estão ganhando peso, uma correlação positiva entre concentrações circulantes de leptina e IGF-I, e de leptina e insulina foi encontrada. Assim, insulina, IGF-I e leptina estão positivamente associados com peso corporal e ECC.

4.4 RADIOIMUNOENSAIO PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS HORMÔNIOS METABÓLICOS

Dentre os numerosos bio-ensaios quantitativos existentes, o radioimunoensaio (RIA) é talvez o mais bem estabelecido. Em 1960, Yalow e Berson desenvolveram um ensaio para detectar e quantificar a insulina no soro de pacientes utilizando anticorpos anti-insulina, baseando-se numa nova técnica de ensaios de ligação por competição, que foi a partir de

então utilizado para medir níveis críticos de hormônios circulantes (YALOW; BERSON, 1960).

A base do RIA é a inibição competitiva da ligação ao anticorpo do hormônio marcado pelo hormônio não marcado, contido em padrões ou em amostras desconhecidas, e constitui um método bastante sensível para a análise quantitativa das reações antígeno-anticorpo, com um limiar de detecção na ordem de picogramas. A técnica baseia-se na premissa de que pequenas concentrações do antígeno (hormônio) podem ser detectadas de acordo com a capacidade do anticorpo específico em se ligar a ele. A adição de hormônio marcado com isótopo radioativo irá competir em igualdade de condições com o hormônio da amostra pelo mesmo anticorpo especifico (YALOW, 1988; HOCKFIELD et al., 1993).

A medida da ligação do antígeno marcado com o anticorpo é feita através da contagem das emissões radioativas por minuto (CPM - contagens por minuto). Após a contagem, desenha-se uma curva-padrão que expressa a relação entre a porcentagem de ligação do hormônio com o anticorpo específico e a sua concentração, em ng/ml A curva-padrão, elemento crucial no RIA, é confeccionada com quantidades conhecidas de hormônio não marcado para inibir a ligação do hormônio marcado ao anticorpo (MOUDGAL; MADHWA RAJ, 1974). A concentração do hormônio de interesse na amostra é determinada através da comparação entre a quantidade de hormônio marcado deslocado pelo hormônio não marcado da amostra com o deslocamento observado nas amostras da curva (HOCKFIELD et al., 1993).

Diante da possibilidade de variação, os ensaios devem ser acompanhados de pontos controle, que são repetidos em todos os ensaios, para o controle do coeficiente de variação intra e inter-ensaio (YALOW, 1988).

Os valores de referência avaliados nos ensaios são: contagem total (TC) que consiste no valor total de CPM do hormônio marcado com radioativo; ligação não específica (NSB) e a ligação máxima (MB) entre o antígeno marcado e o anticorpo.

4.4.1 Marcação do Hormônio com Isótopo Radioativo do Iodo^{125} – Iodação

Quase todos os hormônios protéicos podem ser marcados com o I^{125}, isótopo radioativo do Iodo que possui meia vida de 60 dias e emite radiação gama de 35 KeV. Os hormônios não possuem Iodo em sua molécula, mas podem passar a ter sem que haja alteração de suas propriedades químicas e principalmente imunológicas. A iodação com o I^{125}

se faz na razão de 1 átomo por molécula, procurando sempre obter hormônios com alta atividade específica, dada a pequena quantidade de hormônios existentes nos fluídos biológicos, e ao mesmo tempo procurando evitar a lesão radioquímica, isto é, danos causados às moléculas hormonais pelos efeitos das radiações ionizantes às ligações moleculares. A iodação se faz por substituição do átomo de hidrogênio do anel fenólico da tirosina por um átomo de iodo oxidado, através da ativação da posição ortho do anel aromático da tirosina em função do ataque eletrofílico do grupo hidroxila vizinho. O íon Iodo (I^+) atua como agente eletrofílico, adquirindo assim propriedade de marcador radioativo (SALACINSKI et al., 1981; FERREIRA, 1983).

Um estudo indica que o método Tetracloro (Iodogen®) apresenta grande incorporação ao iodo podendo ser utilizado para uma grande variedade de proteínas e produzindo um marcador estável por até 3 meses (SALACINSKI et al., 1981).

4.4.2. Produção de anticorpos

O radioimunoensaio utiliza anticorpos como proteína de ligação para o hormônio a ser quantificado. Para que possa ser utilizado no ensaio hormonal, tal anticorpo deve ser específico, sensível e com titulação suficiente para a realização dos ensaios propostos (GOLDSMITH, 1975).

A produção de anticorpos em laboratório requer tanto facilidade na manipulação do animal escolhido para o desenvolvimento do protocolo de inoculação, quanto tempo para o desenvolvimento do protocolo. Resultados satisfatórios têm sido obtidos com a utilização de coelhos, já que esses animais têm tamanho suficiente para suportar as colheitas freqüentes de sangue e para serem manuseados com facilidade (MOUDGAL; MADHWA RAJ, 1974; GOLDSMITH, 1975).

As técnicas de produção de anticorpos são empíricas. As imunizações são efetuadas com moderadas quantidades de proteína, o que permitiria que somente células imunogênicas de alta afinidade fossem estimuladas, produzindo anticorpos com alta afinidade (PARKER, 1971). O antígeno é emulsionado ao adjuvante de Freund, uma solução antígena emulsificada em óleo mineral, cuja forma completa é feita de micobactérias neutralizadas dessecadas, usualmente *M. tuberculosis*, suspensa na fase óleo, eficaz na estimulação da imunidade mediada por células (imunidade celular) e capaz de potencializar a produção de

imunoglobinas em alguns animais. A forma incompleta do adjuvante não contém micobactérias (PARKER, 1971).

Os protocolos de imunização são variáveis, diferindo entre eles na dose total do hormônio administrado, via de administração e na duração das imunizações. Geralmente é utilizado o hormônio diluído em solução salina, emulsionado com adjuvante de Freund e injetado em doses iguais e em diferentes locais de aplicação. As imunizações são repetidas com intervalos de 2 semanas por 3 aplicações e depois a realização de reforços com maior intervalo entre as aplicações. As colheitas de sangue são iniciadas 2-3 semanas após a primeira imunização. (MOUDGAL; MADHWA RAJ, 1974; GOLDSMITH, 1975). Entre 53 e 107 dias após o início do protocolo, pode-se encontrar picos na titulação dos anticorpos produzidos (VAITUKAITIS et al., 1971).

A escolha da dose do antígeno inoculado leva em consideração 2 importantes critérios: a quantidade ótima para se obter a resposta mais intensa e a dose mínima provável para induzir a produção de anticorpo policlonal. A quantidade mínima de antígeno capaz de induzir à resposta imune irá depender da natureza do antígeno e do animal inoculado. Em coelhos, a dose mais utilizada por inoculação é de 100 μg por animal. As doses de reforço podem seguir a mesma dose da inoculação primária, diferindo apenas na utilização do Adjuvante de Freund, completo na prima inoculação e incompleto nas demais (HARLOW; LANE, 1988)

A diluição do anticorpo, ou título, depende da afinidade desse anticorpo pelo antígeno. Fatores como o tipo de solução tampão de ensaio, a atividade específica do marcador radioativo, a duração dos períodos de incubação e a temperatura de incubação podem também afetar o título. Conseqüentemente, a titulação apropriada de cada ensaio deve ser determinada empiricamente. Para tal, diluições seriadas do anticorpo devem ser preparadas e testadas, construindo uma curva de titulação (FERREIRA, 1983; HOCKFIELD et al., 1993).

4.4.3. Validação do RIA

Para que um sistema de quantificação hormonal seja válido são necessários controles rigorosos. Alguns critérios, como a especificidade, acurácia, sensibilidade e precisão devem ser analisados para que se valide um ensaio (FERREIRA, 1983) e depois de estabelecidos esses parâmetros, deve-se realizar testes de paralelismo, de estabilidade, de efeito matriz e de

recuperação para completar a validação. Além disso, as amostras devem ser sempre analisadas em duplicata. O ensaio deve ser padronizado quanto ao volume dos reagentes utilizados, quantidade de antígeno marcado com radioativo, tempo e temperatura dos períodos de incubação. Todos os ensaios devem incluir uma curva padrão e controles. Os controles devem ser incluídos no início, meio e fim de todos os ensaios, de maneira a detectar variações relacionadas às amostras envolvidas (PARKER, 1981).

Especificidade é a propriedade de um anticorpo se ligar apenas a um determinado antígeno (hormônio), marcado ou não marcado. As vezes, o anticorpo se liga apenas ao hormônio de uma determinada espécie animal, sendo incapaz de reagir com o mesmo hormônio de outras espécies, podendo ser considerado espécie-específico. A especificidade constitui um controle que é conseguido em alto grau pelo próprio sistema de utilização de anticorpos. (FERREIRA, 1983; HOCKFIELD et al., 1993).

Um método bastante utilizado para a verificação da especificidade é o teste de paralelismo. Nesse teste, diluições seriadas dos controles devem se ligar ao anticorpo de maneira paralela à ligação das amostras da curva ao anticorpo. Se um RIA é específico, diluições seriadas do plasma contendo o antígeno a ser dosado devem inibir a ligação do antígeno marcado ao anticorpo de maneira paralela à inibição da ligação observada na curva pelos padrões. Entretanto se as curvas não são paralelas, o uso do anticorpo será propenso a interferências de outros componentes não identificados (HOCKFIELD et al., 1993)

Outro parâmetro que também pode ser avaliado com o teste de paralelismo é a sensibilidade, que se trata da menor concentração que o ensaio consegue detectar (FERREIRA, 1983).

Algumas moléculas existentes no plasma podem causar interferência nos resultados do ensaio, por levarem à degradação antigênica, alterações na ligação não específica, reações cruzadas e comprometimento na separação do antígeno livre do antígeno ligado. Essas moléculas (como debris celulares, por exemplo) podem causar alterações de pH, afetando a ligação do antígeno ao anticorpo (PARKER, 1981). Os agentes que causariam a interferência inespecífica podem estar presentes nas soluções tampão, no marcador, no anticorpo, ou mesmo na própria amostra (HOCKFIELD et al., 1993). Assim, não se pode inferir que resultados obtidos em ensaios desenvolvidos com solução tampão irão apresentar resultados válidos em amostras biológicas como plasma ou soro (PARKER, 1976).

A Precisão de um ensaio, avaliada pela medida dos coeficientes de variação intra e inter-ensaio, determina a sua qualidade. O coeficiente intra-ensaio é obtido pelo cálculo do coeficiente de variação das duplicatas tanto dos controles estabelecidos no ensaio quanto de

todas as amostras contidas dentro de um ensaio. O coeficiente inter-ensaio é expresso como o coeficiente de variação das duplicatas dos controles. É a medida de reprodutibilidade dos resultados das mesmas amostras em diferentes ensaios. Esse valor consiste em um controle de qualidade de grande importância e que deve ser sempre conferido (FERREIRA, 1983; HOCKFIELD et al., 1993).

A validação de um ensaio é muitas vezes negligenciada Normalmente, modificações dos protocolos são suficientes, em outros casos, mudanças mais radicais, como a adequação de algum reagente. A validação requer tempo já que é necessário colher e comparar um grande numero de amostras para se chegar a conclusões validas. Isto é, entretanto, imperativo para a correta validação de um RIA (FERREIRA, 1983; HOCKFIELD et al., 1993).

4.4.4 Ria para leptina

Atualmente, um kit multi-espécie para quantificação de leptina está disponível comercialmente, no entanto, os resultados para a espécie bovina são questionáveis devido à baixa especificidade do anticorpo. De acordo com Ehrhardt et al. (2000), a aplicação do kit de RIA multi-especifico para ovinos e bovinos resultam em valores baixos e não responsivos em situações de alteração nutricional e obesidade. Assim, buscando uma técnica eficiente e confiável para a quantificação da leptina, ensaios para a quantificação de leptina bovina e ovina vêem sendo desenvolvidos (BLANCHE et al., 2000; DELAVAUD et al., 2000; EHRHARDT et al.,2000; KAUTER et al., 2000).

EXPERIMENTO 1

VALIDAÇÃO DE RADIOIMUNOENSAIO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LEPTINA PLASMÁTICA BOVINA

5 INTRODUÇÃO

A descoberta da leptina (ZHANG et al., 1994) trouxe mudanças nos campos da endocrinologia, nutrição e metabolismo. Esta proteína, de 16 kDa, produzida pelos adipócitos age como sinalizador metabólico sobre as reservas corporais para o sistema nervoso central (CAMPFIELD et al., 1995; FRIEDMAN; HALAAS, 1998; EHRHARDT et al., 2000). Para melhor compreender o papel fisiológico da leptina, a quantificação precisa e sensível de sua concentração nos fluidos corporais, como soro e plasma, se fez necessária. Vários pesquisadores desenvolveram radioimunoensaios utilizando anticorpos policlonais contra leptina recombinante humana (MA et al., 1996), bovina (BLACHE et al., 2000; EHRHARDT et al., 2000; KAUTER et al., 2000) e ovina (DELAVAUD et al., 2002; SAUERWEIN et al., 2004). No entanto, como a disponibilidade do anticorpo específico para a leptina bovina é limitada, houve a necessidade de produzi-lo. Assim, o objetivo deste experimento foi a validação de um radioimunoensaio específico para a leptina bovina, utilizando o anticorpo anti-leptina eqüina produzido através de protocolo de inoculação de leptina em coelhos.

6 MATERIAL E MÉTODOS

Para a validação do ensaio, inicialmente foi produzido o anticorpo especifico, através da inoculação em coelhos de leptina recombinante eqüina (*r-eLEP*). Na seqüência, os procedimentos para a elaboração do RIA, como iodação e a confecção da curva padrão foram testados e depois realizados .

6.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI-LEPTINA EQÜINA

Em função do alto custo da leptina recombinante bovina (*r-bLEP*; DSL R01708), conseqüência de um acordo comercial vigente na época da realização do experimento, foi utilizada para a produção de anticorpos a *r-eLEP* proveniente do *Protein Laboratories Rehovot Ltd* (PLR; GERTLER et al., 1998). De acordo com o fabricante a *r-eLEP* apresenta grande homologia com a *r-b*LEP, o que possibilitou utilizá-la na produção dos anticorpos contra a leptina bovina.

6.1.1 Diluição da leptina recombinante

A *r-eLEP* foi diluída a 1µg/5µl e a *r-bLEP*, a 0,5 µg/µl, ambas em água destilada e depois armazenadas como solução estoque em freezer a -80° C.

6.1.2. Inoculação da leptina eqüina em coelho

O protocolo de inoculação da *r-eLEP* em coelho para a produção de anticorpo policlonal foi desenvolvido utilizando informações contidas na literatura (GERTLER et al., 1998; EHRHARDT et al., 2000; DELAVAUD et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2004; SAUERWEIN et al., 2004), conforme figura 1.

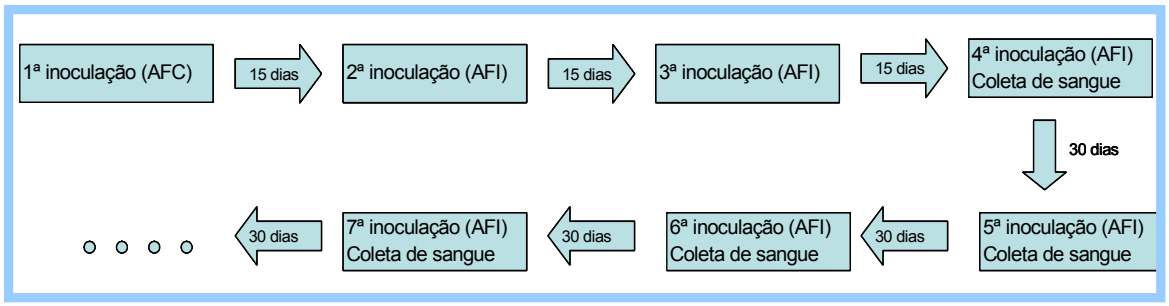

Figura 1 - Esquema de inoculações em coelho para a produção de anticorpos policlonais contra leptina eqüina. AFC: Adjuvante de Freund Completo; AFI: Adjuvante de Freund Incompleto

Foi usado um coelho macho da raça Nova Zelândia, inicialmente com cerca de 8 meses de idade, pesando aproximadamente 3,5 kg, mantido no Laboratório de Experimentação Animal do Curso de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, em ambiente de iluminação (12 h de luz e 12 h de escuro) e temperatura (25°C) controlados, e alimentados com ração e água a vontade.

Para a inoculação primária foram utilizadas 100µg de *r-eLEP* diluída a 1µg/5µl e emulsionada com igual volume de Adjuvante de Freund Completo[1] (Sigma®, cód. F-5881) por animal. A partir da segunda inoculação, utilizou-se a mesma concentração de *r-eLEP*, emulsionada com Adjuvante de Freund Incompleto (Sigma®, cód. F-5506). Todas as inoculações foram feitas por via subcutânea e em diferentes locais de aplicação. A segunda e a terceira inoculações ocorreram com intervalos de 15 dias e a partir da quarta inoculação, o intervalo foi de 30 dias. A partir da quarta inoculação iniciou-se a coleta de sangue da veia auricular do coelho, para a verificação da resposta ao antígeno através de testes de ligação, por radioimunoensaio (RIA).

6.2 IODAÇÃO DA LEPTINA EQÜINA

Em função da provável homologia com a *r-bLEP*, a *r-eLEP* foi utilizada para a marcação com o radioisótopo Iodo^{125} (I^{125}) no processo chamado de iodação. Através da iodação, o I^{125} liga-se à *r-eLEP*, utilizada a partir de então como marcador do ensaio.

---

[1] Adjuvante de Freund: solução antígena emulsificada em óleo mineral. A forma completa contém micobactérias, usualmente *M. tuberculosis*, suspensas na fase óleo e a forma incompleta não contém micobactérias.

Tal processo, desenvolvido de acordo com o método Iodogen® (1,3,4,6-tetracloro 3α, 6α-diphenilglicuril–Sigma Company®), descrito por Salacinski et al. (1981), foi realizado no laboratório de Endocrinologia do Curso de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba.

A reação ocorreu em um frasco de Iodogen® previamente preparado, onde o tetracloro foi pesado e dissolvido em clorofórmio na concentração de 100 µg/ml. Cinqüenta µl dessa solução foram transferidos para frascos de 6x50mm, que permaneceram em capela de exaustão por 16 horas até secagem completa do conteúdo. Após a evaporação do clorofórmio, os frascos foram envolvidos em filme plástico e armazenados à 4°C em dessecador, protegidos da luz, até a utilização.

A iodação, realizada em capela de exaustão com anteparo acrílico impregnado de chumbo, iniciou quando se transferiu para o frasco do Iodogen®, com seringa de precisão Hamilton®, 4 a 10 µl (0,4 a 1,0 mCi) de I^{125} (Amersham, IMS300) e 10 µg de leptina, e durou 90 segundos.

Após o fim da reação, utilizando uma cânula de polipropileno conectada a uma agulha e seringa de 1 ml, transferiu-se o conteúdo do frasco para o topo de uma coluna de Sephadex® G-25M (Amershan Biosciences, cód. 17-0851-01) previamente lavada com 3 ml de tampão fosfato[2] (PB) 0,05 M (tampão fosfato 1M; água destilada), 1 ml de PB acrescido de albumina sérica bovina (PB-BSA) a 1%, 2 ml de PB 0,05 M e por último 2 ml de PB 0,01 M. O material separado pela coluna foi coletado em dezesseis tubos de vidro de borosilicato (Fisher 14-961-26) numerados e contendo 0,5 ml de solução tampão de incubação (KH_2PO 0,01 M, Na_2HPO_4 0,01 M, NaCl, Gelatina 1%, NaN_3, Tween 20). Os tubos contendo o material eluído[3] foram homogeneizados em agitador Kline (Cientec®) por 5 minutos e 5 µl de cada um dos tubos foi contado em contador Gama Cobra II (Packard®). Os tubos contendo material com maior radioatividade (picos orgânicos) foram identificados e separados para a utilização nos ensaios, os demais foram descartados conforme normas do CNEM para descarte de rejeitos radioativos.

---

[2] Na lavagem da coluna, utilizamos tampão fosfato sem NaCl (PB)

[3] Eluição: Dessorção provocada por um fluxo de líquido ou de gás através de um absorvente. (Dicionário Michaelis, disponível no site michaelis.uol.com.br/)

6.3 TESTES DE LIGAÇÃO

Foram comparados o anticorpo produzido contra *r-eLEP* e o anticorpo anti *r-bLEP* fornecido pelo INRA (DELAVAUD et al., 2000), buscando definir qual a diluição em que o anticorpo específico se ligou à *r-eLEP* iodada originando porcentagem de ligação máxima (MB) entre 20 a 30%. Para isso, utilizou-se somente os tubos TC (contagem total), NSB (ligação não específica) e MB. Aos tubos NSB foram adicionados 300 µl de tampão de incubação (KH_2PO 0,01 M, Na_2HPO_4 0,01 M, NaCl, Gelatina 1%, NaN_3, Tween 20) e 100 µl de soro normal de coelho 1:300 (soro de coelho diluído em PBS EDTA 0,05M), aos tubos MB foram adicionados 300 µl de tampão de incubação e 100 µl de soro do coelho que foi inoculado diluído (1:10; 1:50; 1:100, 1:300; 1:500; 1:750 e 1:1000) e a todos os tubos, 100 µl de *r-eLEP* iodada. Após incubar por 24 horas a 4°C, foi adicionado 100 µl de anticorpo inespecífico 1:30 (anti gamaglobulina de coelho diluída em PBS EDTA 0,01M) e polietileno glicol (PEG) 6%, permanecendo por mais 3 horas à temperatura ambiente, sendo então centrifugado a 4°C e a radioatividade remanescente lida em contador gama (Cobra II – Packard®) por 1 min/tubo.

Os testes de ligação foram realizados também para a determinação dos volumes dos reagentes, da atividade do hormônio marcado e dos períodos de incubação utilizados para o ensaio.

Para a interpretação dos resultados, obtidos em CPM, que consiste na contagem da radiação emitida por minuto durante a leitura dos tubos, foi calculada a porcentagem de ligação, onde o valor em CPM da NSB foi subtraído do valor em CPM da MB e o resultado dividido pelo valor em CPM do TC e então multiplicado por 100 [(MB – NSB/TC)*100].

6.4 DILUIÇÃO DA CURVA PADRÃO DE *r-bLEP* E *r-eLEP*

Foram preparadas curvas-padrão tanto com *r-eLEP* quanto com *r-bLEP*, a partir de diluições seriadas da solução estoque para a obtenção dos pontos com as seguintes concentrações: 0,125 ng/ml; 0,25 ng/ml; 0,5 ng/ml; 1,0 ng/ml; 2,0 ng/ml; 4,0 ng/ml; 8,0 ng/ml e 10 ng/ml. As curvas confeccionadas com *r-bLEP* e *r-eLEP* foram comparadas posteriormente em testes de ligação.

6.5 TESTES DE VALIDAÇÃO

Depois de estabelecidas as diluições do anticorpo específico e não específico e dos outros reagentes utilizados na confecção do ensaio, assim como os tempos e temperaturas de incubação em cada fase, pelos testes de ligação, foram realizados testes para validação do RIA para quantificação de leptina bovina. Todos os testes foram realizados com as amostras em duplicata e repetidos 3 vezes, obedecendo as concentrações, volumes, temperaturas e períodos de incubação determinados.

6.5.1 Protocolo para quantificação de leptina adaptado de GYULA HUSZENICZA[4]

Inicialmente, 100µl de cada ponto da curva padrão e dos controles alto (plasma de vaca gorda, escore de condição corporal 4) e baixo (plasma de vaca magra, escore de condição corporal 1) foram pipetados em tubos de borosilicato (12x75) contendo 300 µl de tampão de incubação, seguido da adição de 100 µl do anticorpo específico (1:500) a todos os tubos, exceto NSB, nos quais adicionou-se somente o tampão de incubação e o *SNC*, e aos MBs,somente tampão de incubação e primeiro anticorpo, e foram incubados por 48 h a 4°C.

Todos os tubos receberam 100 µl de *r-eLEP* iodada (aproximadamente 10.000 CPM) e foram incubados por 24 h a 4°C. Após esse período, adicionou-se 100 µl do anticorpo inespecífico 1:30 e 500 µl de PEG 6%, e foram incubados por 12 h e depois centrifugados para a separação do antígeno ligado ao anticorpo do não ligado através de precipitação.

A centrifugação foi feita por 30 min a 4°C e 2.620,8xg. Os tubos foram então colocados em *racks* de espuma e invertidos para desprezar o sobrenadante, permanecendo invertidos para secar por pelo menos 30 min sobre papel absorvente. A radioatividade remanescente foi lida em contador gama por 1 min/tubo.

---

[4] GYULA HUSZENICZA: professor/pesquisador do Departamento e Clínica da Reprodução, da Faculdade de Ciência Veterinária de Budapeste, Hungria, comunicação pessoal.

6.5.2 Teste de paralelismo

Para avaliar se a variação na quantidade de hormônio da amostra alterou a porcentagem de ligação do anticorpo anti-*r-eLEP* à *r-eLEP*-iodada, foi elaborado o teste de paralelismo. O controle alto e o controle baixo foram diluídos à 100; 50; 25; 12,5 e 6,25% em solução tampão de incubação e comparados com o log da dose dos pontos da curva padrão confeccionada com leptina bovina.

6.5.3 Testes de especificidade

Os testes de especificidade avaliaram a capacidade do anticorpo contra *r-eLEP* se ligar à leptina bovina. O primeiro teste comparou a ligação do anticorpo contra *r-eLEP* aos pontos das curvas padrão, confeccionadas com *r-bLEP* ou com *r-eLEP*. No segundo teste comparou-se a ligação do anticorpo anti-*r-eLEP* com a ligação do anticorpo anti-*r-bLEP* desafiados com curva padrão elaborada com *r-bLEP*.

6.5.4 Testes de estabilidade

Com o objetivo de avaliar a interferência da variação no tempo e na temperatura sobre a concentração de leptina plasmática durante a realização dos ensaios, fracionou-se uma amostra de plasma bovino em várias alíquotas, submetidas a diferentes temperaturas por vários períodos de tempo.

No primeiro teste (A), uma alíquota foi submetida à temperatura ambiente (26°C) por 30 min; 1; 2; 4 ou 7 h. No segundo teste (B), a amostra foi exposta à 40°C ("banho-maria"), por 1; 2 ou 4 h. No terceiro teste (C), a amostra permaneceu por 1; 2; 3 ou 4 dias refrigerada à 4°C.

6.5.5 Taxa de recuperação ou teste de exatidão

Para estimar qual a porcentagem da identificação da *r-bLEP* pelo anticorpo específico foi realizado o teste de recuperação. Para isso, adicionou-se quantidades definidas de *r-bLEP* suspendida em tampão de incubação, e quantificada por RIA.

6.5.6 Teste de efeito matriz

Existe a possibilidade de proteínas do plasma bovino se ligarem inespecificamente ao complexo antígeno-anticorpo, aumentando a formação do precipitado e a quantidade do hormônio marcado com I^{125} no fundo do tubo. Esse efeito, denominado de efeito matriz, foi avaliado através da comparação de duas curvas-padrão com *r-bLEP*, uma diluída somente em tampão de incubação e outra em tampão de incubação adicionado de 100 µl de plasma bovino com baixa concentração de leptina bovina por tubo, o mesmo volume de plasma utilizado no ensaio.

Este teste submeteu a curva padrão acrescida de plasma bovino às mesmas condições encontradas nos tubos contendo as amostras a serem quantificas, fornecendo as mesmas condições de ligação das encontradas na presença das proteínas no plasma.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das porcentagens de ligação entre as diluições do soro do coelho inoculado com *r-eLEP* e as diluições do anticorpo anti *r-bLEP* fornecido pelo INRA foi feita pelo teste de Mann Whitney. Os testes de especificidade, paralelismo e efeito matriz, foram avaliados pelo teste de correlação linear de Pearson. Os testes de estabilidade foram avaliados pela ANOVA.

Todos os testes utilizaram o programa GraphPad InStat 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA.

Em todos os testes de validação, exceto o teste de exatidão, utilizou-se a porcentagem de ligação ao invés da dose do hormônio porque nem todas as amostras apresentaram leitura da dose (ng/ml).

Fixou-se um erro alfa de 5% para todas as análises.

8 RESULTADOS

8.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI r-*eLEP*

A variação na diluição do plasma do coelho alterou a porcentagem de ligação e depois de 105 dias do início das inoculações, no momento da 6ª inoculação, a utilização do plasma do coelho inoculado com *r-eLEP* diluído a 1:500 resultou em 28,05% de MB.

Não houve diferença ($P > 0,8$) no MB entre o anticorpo contra *r-eLEP* (28,05%) ou contra *r-bLEP* (25,7%) na diluição a 1:500 (Figura.2).

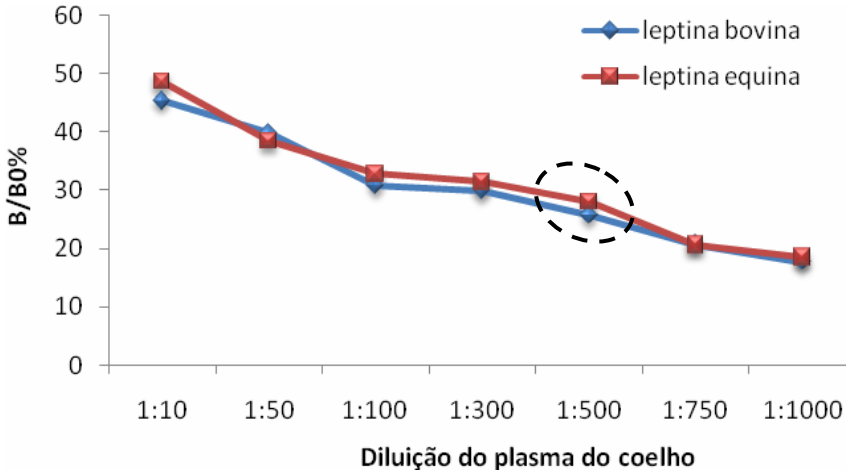

Figura 2 - Comparação entre as porcentagens de ligação obtidas com as diluições do plasma do coelho inoculado com *r-eLEP* e com diluições do anticorpo anti-r-*bLEP* fornecida pelo INRA($P > 0,8$). No gráfico, está assinalada com círculo a diluição utilizada nos ensaios.

8.2 TESTE DE PARALELISMO

A variação na porcentagem de ligação dos pontos da curva padrão e as diluições seriadas dos controles alto (3 ng/ml) e baixo (0,25 ng/ml) resultaram em curvas de deslocamento paralelas (Figura.3). Houve correlação entre a porcentagem de ligação dos

pontos da curva e a diluição do controle alto (r = 0,9961; $P < 0,01$) e entre os pontos da curva e a diluição do controle baixo (r=0,9903; $P < 0,01$). (Figura 4).

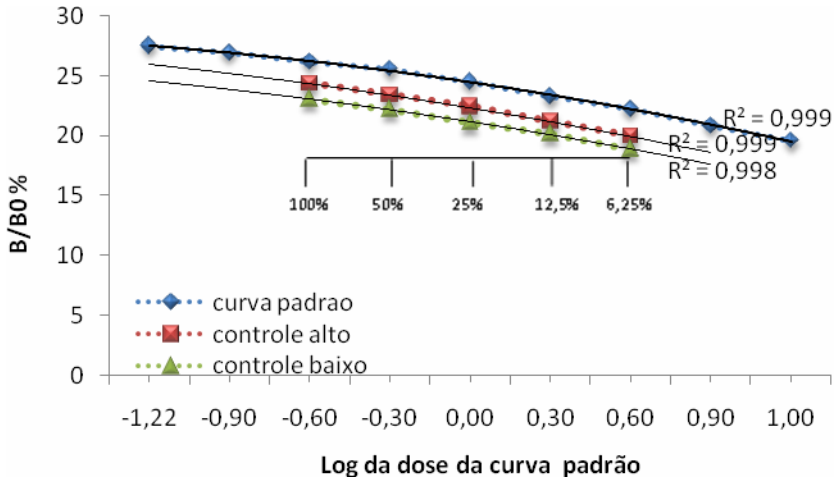

Figura 3 - Teste de paralelismo entre curva-padrão confeccionada com *r-bLEP* e diluições seriadas com 100; 50; 25; 12,5 e 6,25% do volume dos controles alto (3 ng/ml) e baixo (0,25 ng/ml) de plasma bovino diluídos em tampão de incubação, em ensaio utilizando anticorpo anti-*r-eLEP*

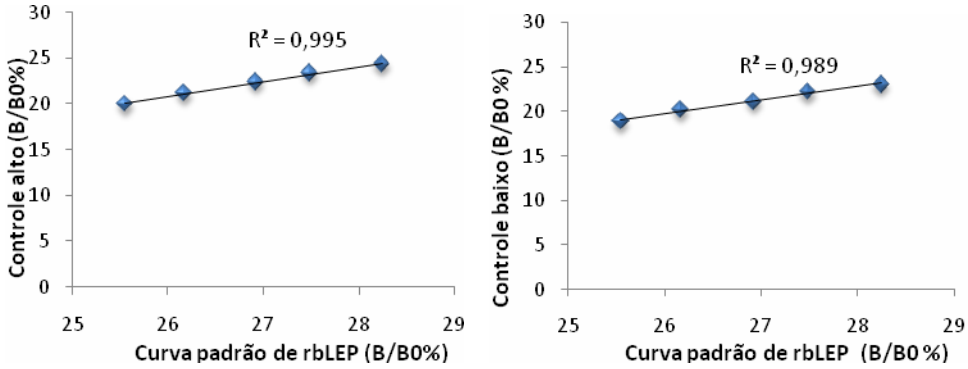

Figura 4 - Correlação linear de Pearson entre as porcentagens de ligação das diluições da curva padrão de *r-bLEP* e dos controles alto (3 ng/ml; r=0,9903, $P < 0,01$) e baixo (0,25 ng/ml; r=0,9903, $P < 0,01$) em ensaio utilizando anticorpo anti *r-eLEP*.

8.3 TESTES DE ESPECIFICIDADE

Quando os pontos das curvas padrão elaboradas com *r-bLEP* ou *r-eLEP* foram comparados em ensaio utilizando anticorpo anti- *r-eLEP*, foi verificado maior deslocamento da porcentagem de ligação da *r-eLEP* iodada ao utilizarmos a curva confeccionada com *r-bLEP*. Esse deslocamento se deu de maneira semelhante, mas não paralela, à curva elaborada com *r-eLEP* (Figura. 5).

Houve correlação (r = 0,9742; $P < 0,01$) entre os valores das porcentagens de ligação das duas curvas (Figura. 6).

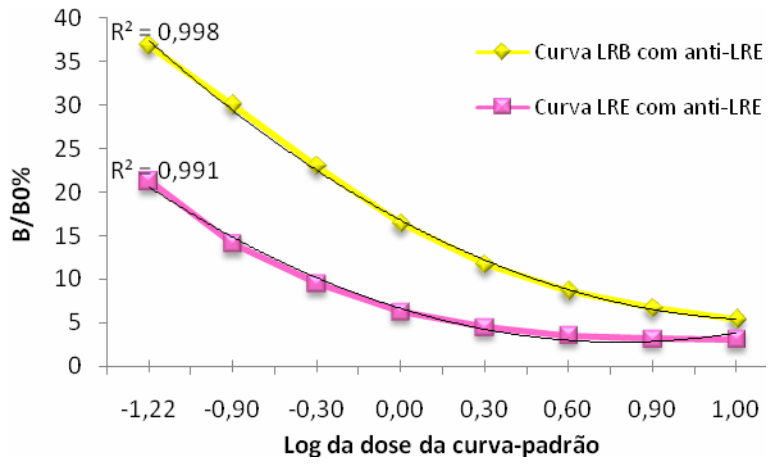

Figura 5 - Comparação entre as porcentagens de ligação dos pontos das curvas-padrão elaboradas com *r-bLEP* e *r-eLEP* em ensaio utilizando anticorpo anti- *r-eLEP*.

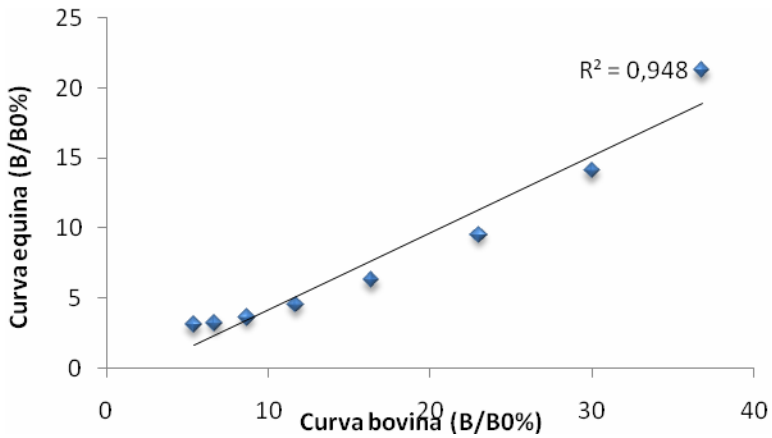

Figura 6 - Correlação linear de Pearson entre as porcentagens de ligação das curvas padrão confeccionadas com *r-bLEP* e *r-eLEP* e anticorpo anti- *r-eLEP* (r = 0,9742; $P < 0,01$).

De maneira semelhante aos resultados anteriores, após comparar a porcentagem de ligação dos pontos da curva padrão elaborada com *r-bLEP* em ensaios utilizando anticorpo anti-*r-bLEP* e anti-*r-eLEP*, observou-se maior porcentagem de ligação dos pontos da curva padrão elaborada com *r-bLEP* ao anticorpo anti-*r-eLEP* (Figura 7), nesse caso, as porcentagens de ligação das curvas foram paralelas e apresentaram correlação (r = 0,9963; $P < 0,01$; Figura. 8).

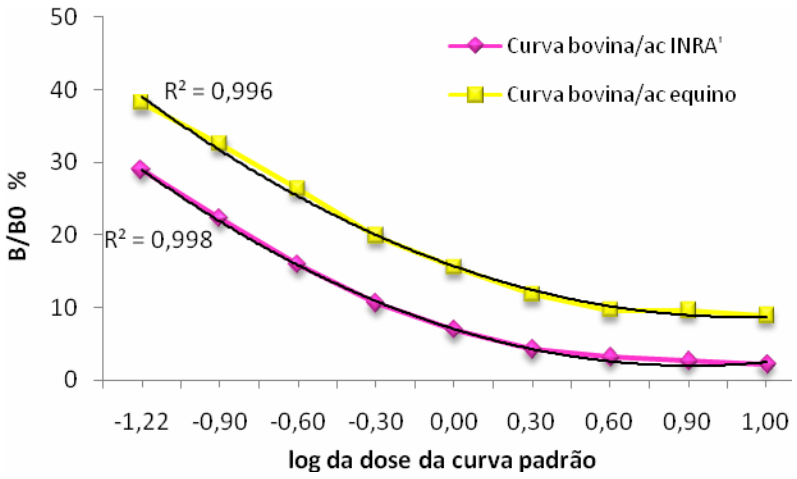

Figura 7 - Comparação entre ensaio utilizando anticorpo anti-*r-eLEP* e ensaio utilizando anticorpo anti*r-bLEP* desafiados com curva padrão feita com diluições seriadas de *r-bLEP*.

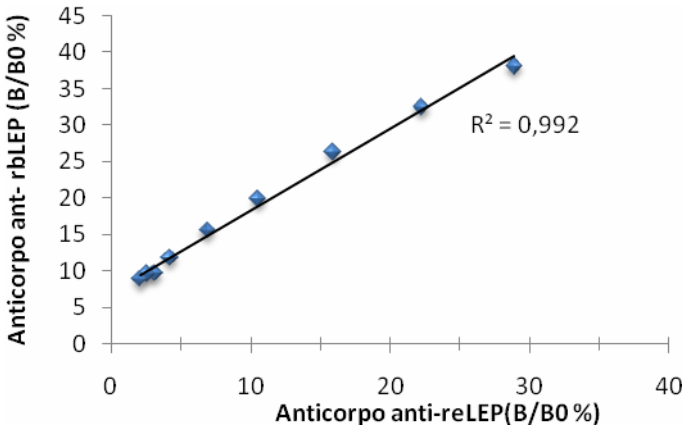

Figura 8 - Correlação linear de Pearson entre as porcentagens de ligação da curva padrão elaborada com *r-bLEP* ao anticorpo anti-*r-eLEP* ou ao anticorpo anti-*r-bLEP* (r = 0,9963; $P < 0,01$)

8.4 TESTES DE ESTABILIDADE

No primeiro teste (Figura. 9, A), onde a amostra permaneceu em temperatura ambiente por 30 min, 1; 2; 4 ou 7 h e no terceiro teste (Figura. 9, C), onde a amostra permaneceu por 1; 2; 3 ou 4 dias à 4°C antes de ser quantificada, não foram detectadas diferenças na variação da porcentagem de ligação ($P > 0,2$). Já no segundo teste (Figura. 9, B), onde o plasma bovino foi submetido à temperatura elevada (40°C) por 1; 2 ou 4 h, observou-se o aumento na porcentagem de ligação conforme aumentava o tempo de exposição à alta temperatura ($P < 0,01$).

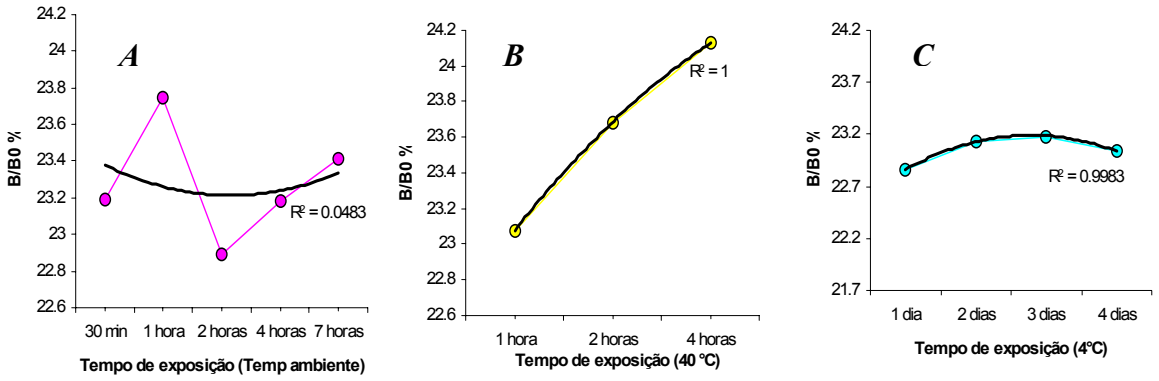

Figura 9 - Testes para a verificação da estabilidade da leptina de amostras de plasma bovino expostas a diferentes temperaturas e períodos de exposição. (A: temperatura ambiente por 30 min, 1; 2; 4 ou 7 horas, $P > 0,4$; B: 40°C por 1; 2 ou 4 h, $P < 0,01$; C: 4°C por 1; 2; 3; ou 4 dias, $P > 0,2$).

8.5 TAXA DE RECUPERAÇÃO OU TESTE DE EXATIDÃO

Quando quantidades conhecidas de *r-bLEP* (0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8,0 e 10,0 ng/ml) foram adicionadas ao tampão, a taxa de recuperação encontrada variou de 98,4 a

101,67%, o que significa que no ensaio realizado essa foi a porcentagem de *r-bLEP* que foi reconhecida pelo anticorpo anti-*r-eLEP* (Figura. 10).

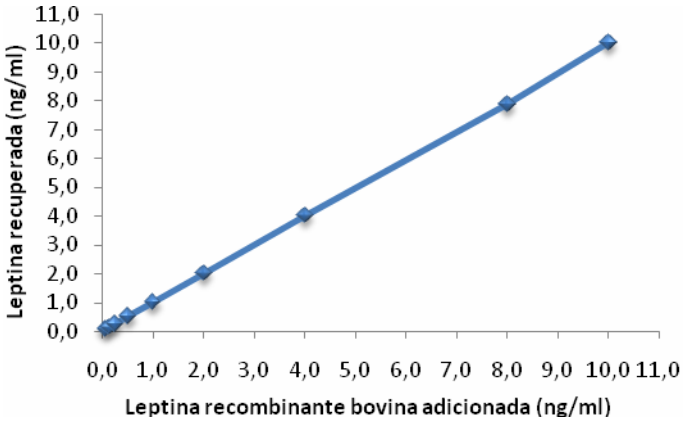

Figura 10 - Recuperação de quantidades conhecidas (0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8,0 e 10,0 ng/ml) de *r-bLEP* adicionada à tampão de incubação e submetida ao RIA para quantificação da leptina, a taxa de recuperação variou de 98,4 % a 101,67 %.

8.6 TESTE DE EFEITO MATRIZ

Não houve diferença na porcentagem de ligação da leptina bovina, presente na curva padrão, ao anticorpo anti-*r-eLEP* utilizando tampão de incubação ou tampão de incubação acrescido de 100 µl de plasma bovino com baixas concentrações de leptina ($P > 0,3$; Figura. 11). Houve correlação (r=0,9937; $P < 0,01$) entre as duas curvas (Figura.12).

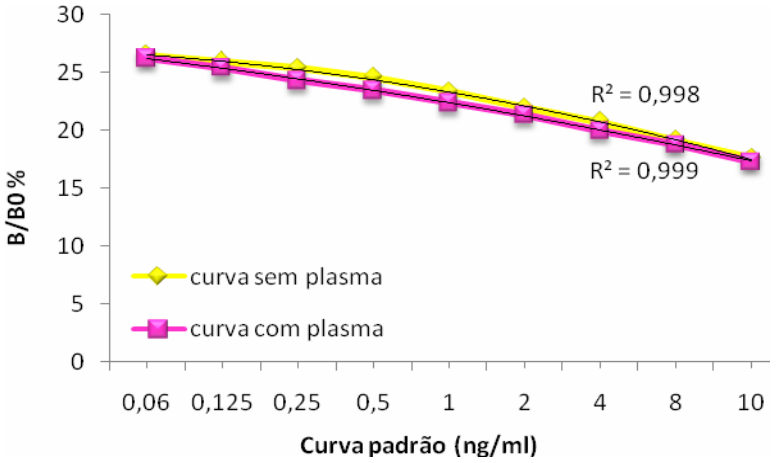

Figura 11 - Comparação da porcentagem de ligação da *r-bLEP* da curva padrão ao anticorpo anti-*r-eLEP* após diluição em tampão de incubação ou tampão de incubação acrescido de plasma bovino para a curva padrão.

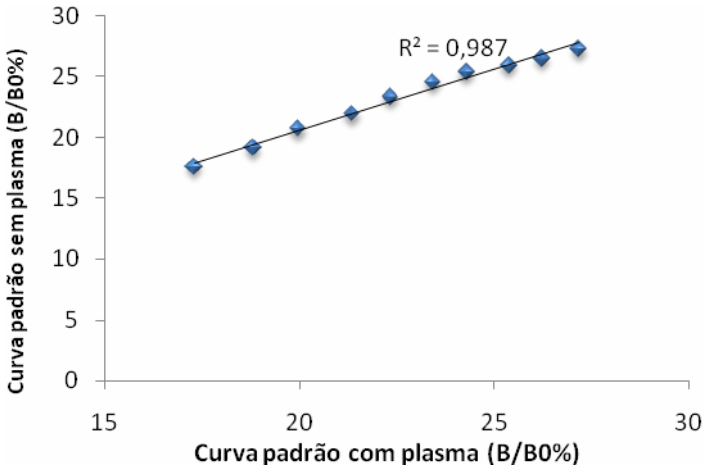

Figura 12 - Correlação linear de Pearson entre as curvas diluídas com tampão de incubação e tampão de incubação adicionado de plasma bovino para a determinação do efeito matriz ($r=0,9937$; $P < 0,01$).

9 DISCUSSÃO

As inoculações com *r-eLEP* em coelho resultaram na produção de anticorpos com afinidade para a leptina bovina semelhante à afinidade do anticorpo anti-*r-bLEP* fornecido pelo INRA, que foi verificado após a comparação das porcentagens de ligação utilizando várias diluições de ambos os anticorpos em testes de ligação (Figura. 2).

O protocolo de inoculação em coelhos (GOLDSMITH, 1975; MOUDGAL e MADHWA RAJ, 1974), resultou em 28,05 % de MB, com soro diluído 1:500, aos 105 dias do experimento, o que coincidiu com o resultado obtido por Vaitukaitis et al. (1971) que detectaram picos na titulação dos anticorpos produzidos entre 53 e 107 dias após o início do protocolo de imunização. Ehrhardt et al. (2000) obtiveram 35-40% de MB e 3% de NSB após a 5ª inoculação em coelho com 100 µg de *r-bLEP* emulsionada em adjuvante de Freund®.

Depois de confirmada a afinidade do anticorpo à leptina bovina e determinada sua titulação, foi realizada padronização de volume total da reação, volume do tampão utilizado, atividade do hormônio marcado, duração e temperatura dos períodos de incubação. Todos os ensaios incluíram uma curva padrão elaborada com leptina recombinante bovina, diluída em tampão de incubação e todos continham referências ou controles altos e baixos, localizados no início e final de ensaio para detectar variações intra e inter-ensaio. Após o ensaio padronizado, foram feitos os testes para a sua validação, segundo Parker (1981).

No teste de paralelismo, a porcentagem de ligação da curva padrão e as diluições seriadas dos controles alto e baixo se correlacionaram, o que significou que o anticorpo anti-*r-eLEP* reconheceu a *r-bLEP* da curva e a leptina presente no plasma bovino dos controles de maneira semelhante, assim como suas variações, de maneira proporcional (Figura. 3 e 4; EHRHARDT et al., 2000).

Nos testes de especificidade, após comparação das curvas padrão elaboradas com *r-bLEP* e *r-eLEP*, utilizando o mesmo volume dos reagentes, a mesma atividade da *r-eLEP* iodada e mesma titulação do anticorpo (1:500), foi notada maior porcentagem de ligação entre o anticorpo anti-*r-eLEP* e a curva padrão bovina, o que significa que houve maior ligação do anticorpo anti-*r-eLEP* à *r-eLEP* iodada, provavelmente pela maior especificidade. No entanto, o anticorpo anti-*r-eLEP* reconheceu a *r-eLEP* e a *r-bLEP* de maneira semelhante, o que pode ser comprovado pela figura 5 e pela correlação positiva, figura 6. As curvas padrão foram paralelas (Figura. 7) e com correlação positiva (Fig87ura.8). Esses resultados permitiram

assumir que o anticorpo anti-*r-eLEP* é eficiente e apresenta sensibilidade e especificidade suficiente para quantificar leptina bovina.

Nos testes de estabilidade, não foi encontrada diferença na porcentagem de ligação quando as amostras foram mantidas em temperatura ambiente ou a 4°C, o que significa que a permanência por até 7 h à temperatura ambiente ou 4 dias à 4°C não causou alterações à leptina mensurável pelo ensaio ($P > 0,2$; $R^2 = 0,998$). A mesma estabilidade não aconteceu conforme aumentou-se o período de exposição da amostra à 40°C, que resultou em um aumento significativo na porcentagem de ligação. Como a porcentagem de ligação da leptina iodada é inversamente proporcional à concentração de leptina presente na amostra, a diminuição na concentração de leptina plasmática em função do tempo de exposição à 40°C, provavelmente devido a alterações estruturais no hormônio, o impediram de ser reconhecido pelo anticorpo. Ma et al. (1996), após submeterem amostras 37°C, encontraram estabilidade na concentração de leptina plasmática por até 1 dia, ou por 1semana à temperatura ambiente ou por até 2 meses à 4°C.

A exatidão, obtida com a taxa de recuperação de 98,4 a 1001,67%, conferiu ao ensaio confiabilidade, pois através dela sabemos que este está sendo eficiente em reconhecer a leptina adicionada com uma variação inferior a 2%.

Apesar de não ser possível assumir com precisão que ensaios hormonais utilizando tampão de incubação apresentem resultados similares àqueles obtidos com amostras biológicas (PARKER 1981), não foi detectada diferença entre as curvas padrão elaboradas com *r-bLEP* diluída em tampão de incubação ou em tampão de incubação acrescido de plasma bovino. Acredita-se que o efeito matriz, causado pela ligação de substâncias presentes no plasma, provavelmente proteínas, aumentariam aa porcentagem de ligação por aumentarem a formação do precipitado, o que não aconteceria nas amostras da curva diluídas somente em tampão de incubação. Assim, como não foi encontrado esse efeito no teste realizado, foi adotado para a realização dos ensaios para a quantificação da leptina bovina a curva padrão diluída em tampão de incubação sem a adição de plasma.

Pôde-se concluir que o anticorpo anti-*r-eLEP* produzido em coelho apresentou sensibilidade suficiente para detectar concentrações de leptina circulante no plasma bovino quantificadas pelo RIA e que o ensaio para a quantificação de leptina plasmática bovina apresentou sensibilidade, especificidade, precisão e estabilidade, sendo considerado válido e com as características adequadas ao desenvolvimento de um RIA confiável.

EXPERIMENTO 2

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LEPTINA E IGF-I PLASMÁTICOS SOBRE A PUBERDADE E A PRECOCIDADE SEXUAL DE NOVILHAS NELORE (Bos taurus indicus) DO 8° AO 16° MÊS DE IDADE.

10 INTRODUÇÃO

O rebanho nacional de bovinos de corte, que possui cerca de 200 milhões de cabeças de gado, é composto por 80% de animais com sangue zebu, e a raça Nelore predomina nesse cenário (ANUALPEC, 2005). Apesar dos grandes esforços realizados nos últimos anos ainda predominam no Brasil as criações extensivas de baixa produtividade, fazendo-se necessária a aplicação de novas estratégias para a obtenção de animais mais precoces (ROMANO, 1997).

Nos países mais desenvolvidos, a bovinocultura de corte empregou um manejo seletivo no qual as novilhas apresentam o primeiro parto próximo aos dois anos de idade (WOLFE et al.,1990), o que significa aumentar a produtividade reprodutiva, se quando compararmos com novilhas que têm o primeiro parto aos três anos de idade (LEISMEISTER et al., 1973). A redução do primeiro parto de três para dois anos de idade produziria um aumento de 16% no retorno econômico do sistema de criação de gado de corte. Uma observação simplista permite dizer que uma vaca que pare aos dois de idade produziria ao longo da vida, um bezerro a mais do que vacas que parem aos três anos de idade (ELER et al., 2001).

O desenvolvimento de novas ferramentas para auxiliar o processo de seleção genética pode vir do conhecimento dos processos fisiológicos que controlam o sistema reprodutivo, assim como suas interações com outras variáveis, como a nutrição por exemplo. Porém, muitos processos fisiológicos controladores deste sistema ainda não foram bem elucidados e, devido a isto, as técnicas de melhoramento atualmente empregadas são feitas em função das observações dos fenótipos zootécnicos de maior interesse econômico, selecionando animais que expressam características desejáveis.

A concentração de leptina, um hormônio secretado pelos adipócitos, parece aumentar antes da puberdade em novilhas (DIAZ-TORGA et al., 2001; GARCIA et al., 2002), assim como a concentração de IGF-I (JONES et al., 1991; ROBERTS et al., 1990), sugerindo que esses hormônios estejam envolvidos no início da puberdade, atuando como sinalizadores metabólicos para a primeira ovulação em novilhas.

O objetivo deste experimento foi quantificar a concentração de leptina e de IGF-I plasmáticos de novilhas Nelore do 8° ao 16° mês de idade e verificar a possível relação desses hormônios com a primeira ovulação e precocidade reprodutiva.

11 MATERIAIS E MÉTODOS

11.1 LOCAL E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Araçatuba, localizada na região Noroeste do estado de São Paulo (50°26' longitude Oeste e 21°12' latitude Sul).

11.2 ANIMAIS

Foram utilizadas 36 novilhas da raça Nelore contemporâneas, nascidas com intervalo máximo de 35 dias de diferença, filhas de vacas com puberdade precoce cruzadas com touros de grande incidência de filhas precoces, oriundas do plantel da Agropecuária CFM, nascidas e criadas na Fazenda São Francisco em Magda Paulista-SP. Esta empresa, que realizava seleção genética com seus animais quanto à precocidade reprodutiva, possuía um rebanho com incidência de aproximadamente 25% de puberdade precoce nas fêmeas criadas a pasto.

O experimento foi iniciado logo após o desmame das novilhas, aos 8 meses de idade, e terminou quando elas estavam com16 meses de idade.

Antes do início do experimento, as novilhas foram manejadas diariamente para que se habituassem à rotina de trabalho no curral, buscando assim evitar o estresse, o que poderia interferir nos resultados do trabalho.

As novilhas foram divididas retrospectivamente conforme a idade à prenhez durante o experimento, sendo que aquelas que ficaram prenhes até os 16 meses de idade formaram o grupo Precoce (P; n=12), as não prenhes até essa idade formaram o grupo Não Precoce (NP; n=18) e as que não ovularam, formaram o grupo Não ovuladas (NO; n=6).

Todas as novilhas foram mantidas em piquetes de capim Tanzânia (*Panicum maximum*) e suplementadas com silagem de bagaço de milho na quantidade de 5 kg/animal/dia e ração contendo 59% milho, 40% soja e 1% vitaminas e mineral (Polinúcleo

Fatec-Fatec S.A.) em quantidade suficiente para manutenção do crescimento, além de livre acesso ao sal mineral (Fosbov Tortuga®) e água. Foram imunizadas e vermifugadas e a carga parasitária dos animais foi avaliada a cada dois meses, por exame de fezes, realizados no laboratório de Parasitologia do Curso de Veterinária da UNESP de Araçatuba.

11.2.1 Manejo de Inseminação Artificial (IA)

As novilhas foram inseminadas após a detecção do cio, realizada por um rufião com desvio lateral equipado com um buçal marcador (BELOSO et al., 1997). O rufião foi utilizado também para expor as novilhas a um possível "efeito macho", uma vez que no manejo para a seleção de precocidade na fazenda de origem, as novilhas, próximo aos 12 meses de idade, eram expostas ao touro.

11.2.2 Peso

Todos os animais foram pesados a cada 10 dias em balança digital específica para tronco-balança (Toledo®). As médias mensais foram comparadas para todos os animais e entre os grupos P, NP e NO.

O peso foi acompanhado mensalmente e o ganho de peso foi calculado através da diferença entre as pesagens.

11.2.3 Coletas de sangue e determinação das amostras para a quantificação de leptina e IGF-I

As amostras de sangue foram coletadas com intervalos de 4 dias durante todo o período do experimento, dos 8 aos 16 meses de idade das novilhas, diretamente da veia jugular, em tubos à vácuo de 10 ml heparinizados (Vacutainer®) e centrifugados a 3500 RPM por 15 min para a separação do plasma (Centrífuga Fanen Exelsa Baby I modelo 206). Posteriormente o plasma foi aliquotado em duplicata e armazenado, em microtubos de 2,0 ml (Axigen Scientific MCT

– 200B), em freezer a -20°C até a realização dos ensaios no Laboratório de Endocrinologia Veterinária do Curso de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba.

Para visualizar a variação da concentração de leptina plasmática com o avançar da idade, foi feita a sua quantificação em amostras separadas mês a mês, do 8° mês, logo após a desmama, até o 16° mês, no final do experimento. E para compreender sua variação próximo ao momento da ovulação, a leptina foi quantificada das amostras coletadas a cada 4 dias, retrospectivamente nos 60 dias que precederam a primeira ovulação.

A quantificação mensal do IGF-I, do 8° ao 16°mês de idade, foi feita a partir de um *pool* de amostras representativas do mês em questão, e a quantificação do IGF-I das amostras colhidas a cada 4 dias foi feita retrospectivamente nos 56 dias que antecederam a primeira ovulação.

Para a quantificação hormonal 56 ou 60 dias antes da ovulação dos animais NO, foi determinado como sendo o dia zero, equivalente ao dia da ovulação nos animais que ovularam, aquele em que as novilhas NO apresentavam o peso médio mais próximo ao peso médio dos animais que ovularam, no dia da ovulação.

11.3 QUANTIFICAÇÃO DA LEPTINA PLASMÁTICA BOVINA

A quantificação da leptina plasmática bovina foi feita por Radioimunoensaio (RIA), segundo protocolo validado no Laboratório de Endocrinologia Animal da UNESP Araçatuba (experimento 1). Foi utilizada leptina recombinante bovina (*r-bLEP*; DSL-R01708) diluída em água destilada na concentração de 0,5µg/µl, armazenada como solução estoque em freezer a -80°C. Essa solução estoque foi diluída de maneira seriada e utilizada para a elaboração dos seguintes pontos da curva-padrão: 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 e 10 ng/ml.

A iodação foi feita de acordo com o método Iodogen®(SALACINSKI et al., 1981), utilizando leptina recombinante eqüina *r-eLEP*).

Antes de iniciar os ensaios, foram preparados protocolos com a identificação das amostras e dos tubos correspondentes, na ordem prevista, organizados para não excederem 194 tubos cada ensaio, de maneira que todos os tubos fossem centrifugados juntos. A elaboração dos protocolos permitiu não somente a organização dos ensaios, a determinação do número de tubos utilizados e do volume dos reagentes que foi preparado.

Inicialmente, 100µl de cada ponto da curva padrão e das amostras foram adicionadas em tubos de borosilicato (12x75) contendo 300 µl de tampão de incubação, seguido da adição de 100 µl do anticorpo específico diluído 1:500. Aos tubos de ligação não específica (NSB), adicionou-se somente o tampão de incubação e 100 µl do soro normal de coelho (*SNC*) e aos tubos de ligação máxima (MB), tampão de incubação e anticorpo específico. Após permanecerem 48 horas a 4°C, adicionou-se 100 µl da leptina marcada com o I^{125}, com aproximadamente 10.000 CPM, e incubados por 24 horas a 4°C. Em seguida, 100 µl do anticorpo inespecífico (anti-gamaglobulina de coelho) diluído 1:30 em solução PBS EDTA 0,05M, e 500 µl de polietilenoglicol (PEG) 6% foram adicionados aos tubos, imediatamente agitados e incubados por 12h a 4°C. Todos os tubos foram então centrifugados (2.620,8g por 30 minutos a 4°C), colocados em racks de espuma e invertidos, desprezando o sobrenadante e permanecendo invertidos para secar por 30 min sobre papel absorvente. A radioatividade remanescente foi lida em contador gama (Cobra II – Packard®) por 1 minuto/tubo.

A sensibilidade do ensaio foi de 0,03 ng/ml, os coeficientes de variação intra-ensaio foram 2,17% para o controle alto (2,8 ng/ml) e 3,54% para o controle baixo (0,5 ng/ml) e os coeficientes de variação inter-ensaio foram 2,42% para o controle alto e 9,83% para o controle baixo.

11.4 QUANTIFICAÇÃO DO IGF-I PLASMÁTICO BOVINO

O IGF-I foi quantificado pelo Kit DSL com extração (DSL – 5600), cujo procedimento baseou-se em um ensaio imunoradiométrico (IRMA), que incluiu uma etapa de extração simples na qual o IGF-I foi separado das proteínas de ligação no plasma (IGF-BPs). Para isso, 100 µl de amostra e 400 µl de solução de extração foram incubados por 30 minutos e depois centrifugadas. Cem µl do sobrenadante foi separado e colocado juntamente com 500 µl de solução de neutralização.

O ensaio foi realizado em tubos revestidos com anticorpo anti-IGF-I, onde foram adicionados 50 µl dos padrões das amostras da curva, das amostras de plasma e dos controles extraídos e 200 µl de IGF-I iodado. Esses tubos permaneceram por 3 horas à temperatura ambiente em agitador ajustado a 180 RPM. Após a incubação, os tubos, com exceção do TC, foram invertidos, desprezando o conteúdo e depois lavados por três vezes com 3 ml de água

deionizada a cada vez. Os tubos invertidos foram batidos, para que secassem bem, de maneira que não ficasse nenhum resquício de líquido e a leitura foi feita em contador gama (Cobra II – Packard®)por 1 minuto/tubo, com protocolo ajustado para ensaio tipo IRMA.

A porcentagem de ligação máxima foi de 13,9%, e de ligação não especifica 0,53%, a sensibilidade do ensaio foi de 2,5 ng/ml, os coeficientes de variação intra-ensaio foram 1,98% para o controle alto (190,7 ng/ml) e 2,87% para o controle baixo (54,3 ng/ml) e os coeficientes de variação inter-ensaio foram 2,97% para o controle alto e 3,64% para o controle baixo.

12 ANÀLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste t não pareado (GraphPad InStat 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) para avaliar a diferença na idade entre as novilhas P, NP e NO

A variação do peso dos animais foi avaliada por ANOVA para medidas repetidas utilizando-se o proc GLM do programa SAS (System for Windows – SAS Institute InC., Cary, NC, EUA, 1999-2000) comparando os grupos P, NP e NO em função da idade em meses e os resultados se mostraram adequados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias. O peso ao nascimento e à desmama, fornecidos pela fazenda de origem dos animais, foram utilizados como informações adicionais e as novilhas P, NP e NO comparadas pelo teste t não pareado do InStat.

A análise dos resultados das concentrações de leptina e IGF-I plasmáticos obtidos por RIA foi dividida em 2 abordagens: análise dos resultados de todas as novilhas (população) e comparação dos animais de acordo com o grupo Precoce, Não Precoce e Não ovuladas em função do tempo (idade em meses ou em intervalos de 4 dias).

Os resultados referentes à variação na concentração dos hormônios na população e nos grupos em função do tempo, não se mostraram adequados quanto à normalidade dos resíduos segundo teste Shapiro-Wilk ($P > 0,01$), homogeneidade das variâncias segundo Teste F ($P > 0,01$), e apresentaram coeficiente de variação > 30%. Esses dados foram então transformados em raiz quadrada e re-analisados, o que adequou os dados à análise de variância. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) dos dados não transformados.

A análise dos dados foi feita por ANOVA para medidas repetidas, utilizando-se o proc GLM do SAS. As variáveis dependentes foram a concentração plasmática de leptina e de IGF-I (ng/ml) e as variáveis independentes, o intervalo de tempo, grupo e interação grupo x intervalo. O teste *slice* foi feito para separar e comparar as médias dos intervalos de tempo dentro de cada grupo de animais e entre os grupos, dentro dos intervalos de tempo. Para as variáveis que apresentaram variação significativa foi realizado o teste de Duncan como pós-teste para verificar as diferenças entre os momentos.

Foi testada a correlação (Correlação linear de Pearson - GraphPad InStat 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) do peso corporal com a

concentração plasmática de leptina e com o a concentração plasmática de IGF-I nos grupos P, NP e NO.

Fixou-se um erro alfa de 5% para todas as análises ($P < 0,05$).

13 RESULTADOS

13.1 CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

Até o final do experimento, 6 novilhas (16,7%) não ovularam e as 30 (83,3%) que ovularam estavam com 442,09±5,20 dias de idade à primeira ovulação, o que equivale a 14,73±0,18 meses. Entre as 36 novilhas, 12 (33,3%) ficaram prenhes até os 16 meses de idade e foram classificadas como Precoces (P), 18 novilhas (50%) não ficaram prenhes até essa idade e foram classificadas como Não Precoces (NP) sendo que as 6 que não ficaram prenhes porque não ovularam foram classificadas como Não Ovuladas (16,7%; NO).

Não houve diferença ($P > 0,05$) na idade média à primeira ovulação entre os grupos P (439±27,9 dias) e NP (445±36,8 dias), que foi equivalente à 14,6 e 14,8 meses de idade respectivamente.

13.2 PESO

As novilhas nasceram com 31,8±0,44 kg, foram desmamadas com 212,4±2,01 kg e apresentaram um ganho de 0,81±0,02 kg/dia do nascimento à desmama. A primeira ovulação aconteceu quando as novilhas pesavam 298,4±3,86 kg e a diferença de peso entre a desmama e a primeira ovulação foi de 86,1±3,65 kg, o que equivale a um ganho médio de 0,38±0,01 kg/dia.

Não encontramos diferença nos pesos ao nascimento, à desmama, à primeira ovulação, tampouco nos ganhos de peso diários do nascimento à desmama, da desmama `a primeira ovulação e na diferença de peso da ovulação à desmama ($P > 0,5$) entre os grupos P, NP e NO, no entanto, no período compreendido entre a desmama e o final do experimento as novilhas P e NP, que ovularam, apresentaram ganho de peso maior ($P < 0,05$) que as NO (Tab.1).

Tabela 1 - Comparação do peso (kg; média±EPM) ao nascimento, à desmama, à primeira ovulação, media do ganho de peso diário entre o nascimento e a desmama (1) e entre a desmama a

primeira ovulação (2), diferença de peso entre a desmama e a primeira ovulação (3) e ganho de peso diário da desmama até o final do experimento, aos 16 meses (4), de novilhas Nelore Precoces (n=12) e Não Precoces (n=18) em função da prenhez aos 16 meses de idade e Não Ovuladas (n=6)

Grupo	Nascimento	Desmama	1ª ovulação	Ganho de peso (1)	Ganho de peso (2)	Ganho de peso (3)	Ganho de peso (4)
P	31,92±0,6^{A}	213,62±2,18^{A}	296,31±4,57^{A}	0,81±0,02^{A}	0,37±0,03^{A}	82,59±4,84^{A}	0,49±0,02^{A}
NP	31,74±0,06^{A}	211,15±2,7^{A}	299,84±5,31^{A}	0,81±0,01^{A}	0,39±0,02^{A}	88,69±5,33^{A}	0,52±0,01^{A}
NO	31,17±1,1^{A}	210,83±4,78^{A}	-	0,78±0,02^{A}	-	-	0,33±0,03^{B}

A,B: valores diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$).

O peso médio dos 36 animais aumentou 115,60 kg ou 55,22% do 8° mês (209,36±1,65 kg) ao 16° meses de idade (324,96±5,14 kg) e esse aumento passou a ser significativo à partir dos 12 meses ($P < 0,01$; Figura.13).

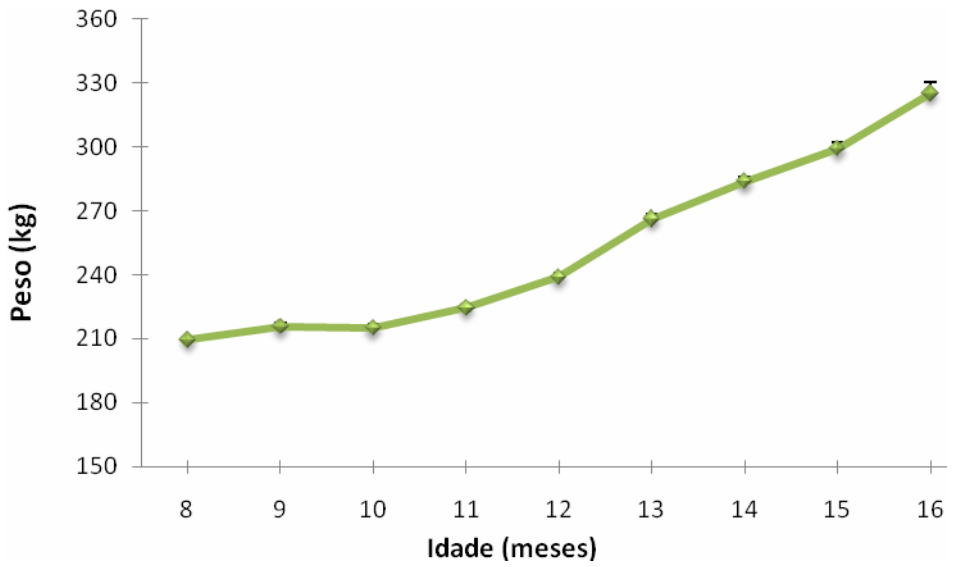

Figura 13 - Variação no peso médio (kg; média±EPM) de novilhas Nelore (n=36) do 8° ao 16° mês de idade.

Foi verificado aumento ($P < 0,01$) no peso das novilhas P e NP a partir dos 12 meses de idade e a partir dos 13 meses nas NO. Nas novilhas P, o peso aumentou de 211±2,45 kg aos 8 meses para 330,5±7,28 kg, aos 16 meses de idade, o que significou um aumento de 56,64%. Nas NP, o peso aumentou de 209,06±2,69 kg aos 8 meses para 335,6±3,3 kg aos 16

meses (60,53%), por outro lado nos animais NO, o peso aumentou 43,96%, de 207±3,48 kg aos 8 meses para 298±13,7 kg aos 16 meses (Figura. 14).

O maior aumento no peso dos animais do grupo P (31,67 kg) aconteceu do 12° para o 13° mês, enquanto o maior aumento no peso dos animais NP (32,16 Kg) e NO (26 kg) foi verificado somente do 15° para o 16° mês (*P* <. 0,01).

A comparação entre os grupos mostrou que a partir do 12° mês, o peso dos animais P e NP diferiu do peso dos animais NO (*P* < 0,01; Figura.14).

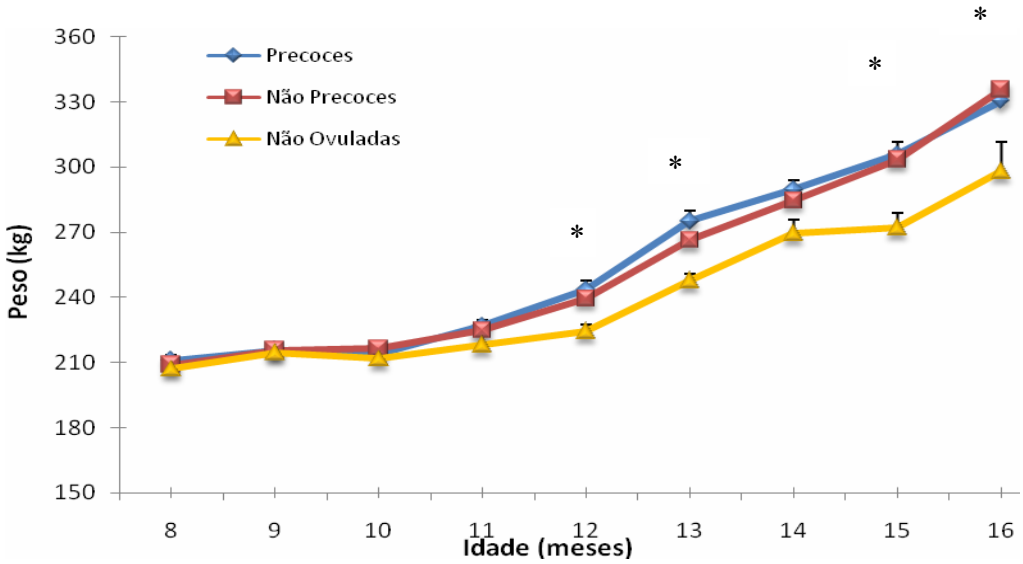

Figura 14 - Variação no peso médio (kg; média ± EPM) de novilhas Nelore (n= 36) dos 8 aos 16 meses de idade nos grupos Precoce (n=12; prenhez aos 16 meses de idade), Não Precoce (n=18) e Não Ovuladas (n=6).

13.3 VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA LEPTINA

13.3.1 De acordo com a idade em meses

Houve aumento (*P* < 0,01) de 135,27% na concentração de leptina plasmática dos 8 (0,10±0,01ng/ml) aos 16 (0,23±0,03 ng/ml) meses de idade quando as 36 novilhas foram avaliadas em conjunto. Dos 11 (0,11±0,02 ng/ml) aos 12 meses de idade (0,19±0,02 ng/ml), observou-se um aumento de 71,2% na concentração de leptina. Aos 15 meses, a leptina

possuía a maior concentração do período analisado (0,30±0,04 ng/ml), correspondendo a um aumento de 71,2% em relação ao mês anterior (0,18±0,02 ng/ml), mas diminuindo 22,8% no 16° mês (0,23±0,03 ng/ml; Figura 15).

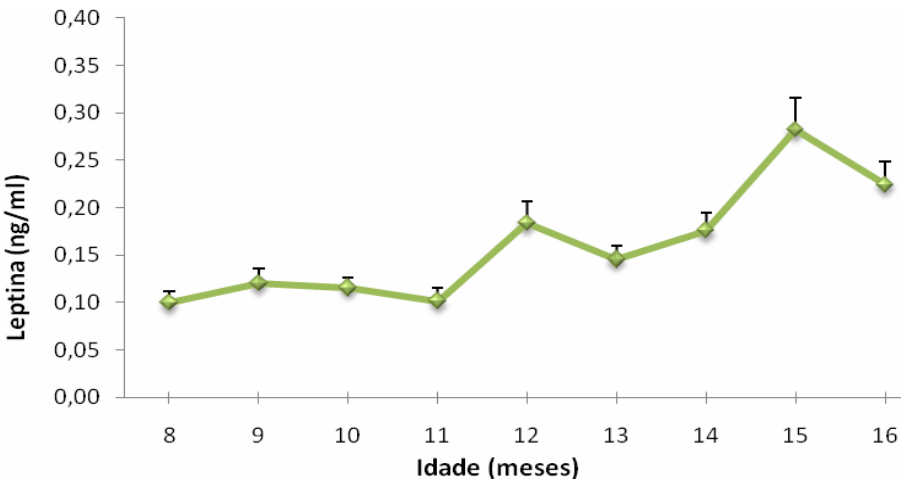

Figura 15. Concentração de leptina plasmática (ng/ml; média ± EPM) de novilhas Nelore (n=36) dos 8 aos 16 meses de idade.

Ao compararmos os 3 grupos, verificamos maior concentração plasmática de leptina nas novilhas NP, enquanto houve diferença entre as P e NO ($P < 0,05$). Nas novilhas P, a concentração de leptina plasmática aumentou ($P < 0,01$) de 0,09±0,02 ng/ml aos 8 meses para 0,15±0,02 ng/ml aos 16 meses de idade (66,7%), aos 15 meses, foi verificada a maior concentração de leptina do grupo (0,22±0,07ng/ml). Nas novilhas NP, a concentração de leptina plasmática aumentou de 0,11±0,01 ng/ml aos 8 meses para 0,29±0,04 ng/ml aos 16 meses de idade (163,6%), e no grupo NO, a concentração de leptina aumentou de 0,10±0,05 ng/ml aos 8 meses para 0,20±0,03 ng/ml aos 16 meses de idade, o que representou um aumento de 100% (Figura 16).

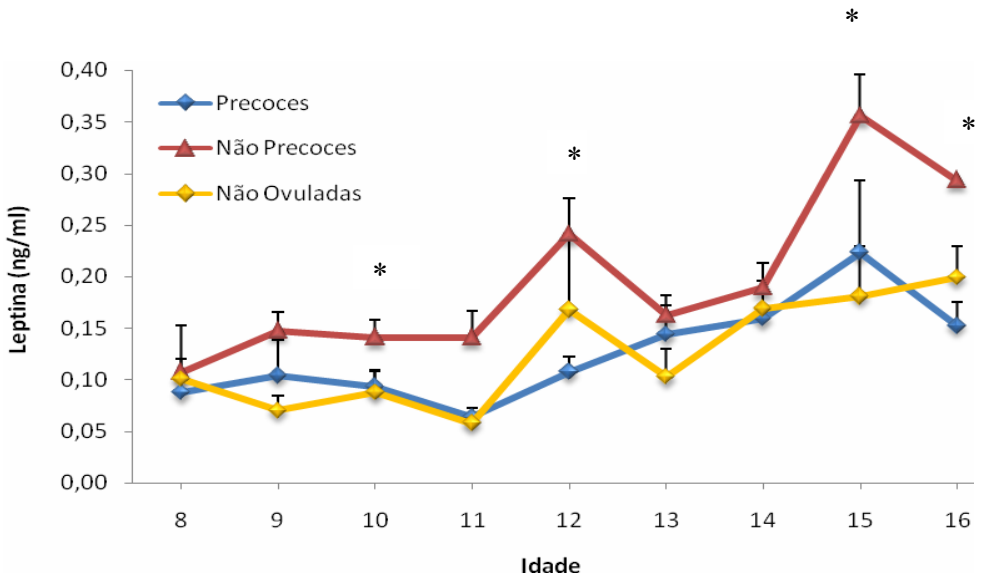

Figura 16. Concentração de leptina plasmática de novilhas Nelore dos 8 aos 16 meses de idade (ng/ml; médias ± EPM), separadas em Precoces (prenhez aos 16 meses de idade, n=12), Não Precoces (n=18) e Não Ovuladas (n=6).

13.3.2 Variação na concentração de leptina próximo à primeira ovulação

Nos 60 dias que precederam a primeira ovulação das 36 novilhas, foi possível observar um aumento ($P < 0,01$) de 0,19±0,03 ng/ml para 0,38±0,04 ng/ml (100,56%; Figura. 17) na concentração de leptina plasmática.

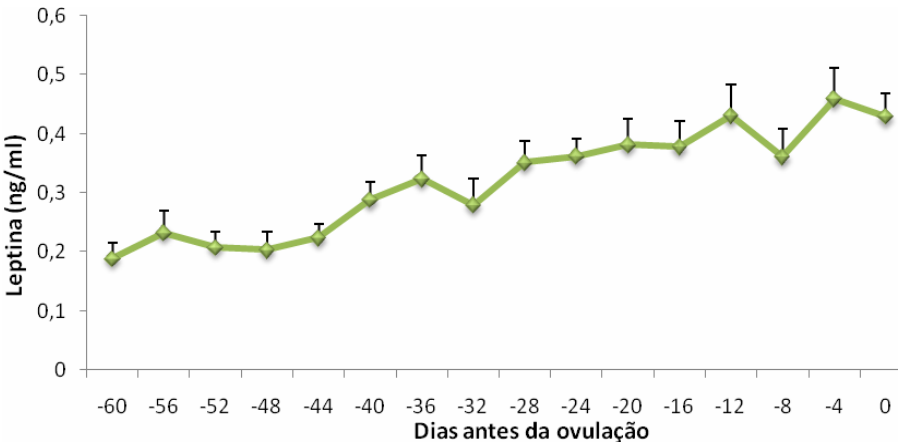

Figura 17 - Concentração de leptina plasmática (ng/ml; médias ± EPM) nos 60 dias que antecederam a primeira ovulação (amostras colhidas a cada 4 dias) em novilhas Nelore (n=36) .

Não houve diferença na concentração de leptina plasmática entre os grupos P, NP e NO nos 60 dias anteriores à primeira ovulação ($P > 0,5$; Figura 18).

Nas novilhas P a concentração plasmática de leptina aumentou progressivamente 184,21%, de 0,19±0,03 ng/ml para 0,54±0,10 ng/ml ($P < 0,01$) nos 60 dias que antecederam a primeira ovulação. Nos animais NP o aumento, de 164,28%, não foi significativo ($P > 0,5$), variando de 0,14±0,04 ng/ml para 0,37±0,07 ng/ml no dia da ovulação. Nos animais NO, assim como nos NP, não houve efeito de intervalo ($P > 0,5$) e a leptina plasmática variou de 0,31 ng/ml para 0,24 ng/ml no dia da ovulação, diminuindo 22,58% durante o período (Figura 18).

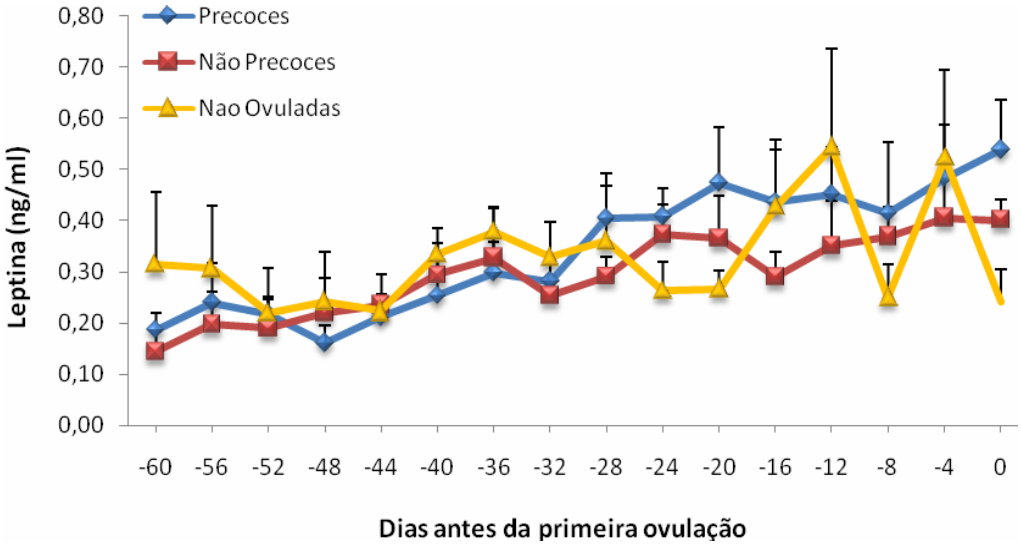

Figura 18 - Concentração de leptina plasmática (ng/ml; médias ± EPM) nos 60 dias antes da primeira ovulação (dia zero) em novilhas Nelore nos grupos Precoce (prenhez até 16 meses de idade; n=12), Não Precoce (n=18) e Não Ovuladas (n=6).

13.4 CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE LEPTINA PLASMÁTICA E O PESO CORPORAL

Durante o período dos 8 aos 16 meses de idade a concentração da leptina plasmática das novilhas apresentou correlação com o peso corporal tanto no grupo P (r =0,3679; $P < 0,01$), quanto no grupo NP (r = 0,4313; $P < 0,01$). No entanto, nos animais NO não foi

verificada correlação entre a concentração de leptina plasmática e o peso corporal (r=0,095 e *P*=0,5306; Figura. 19).

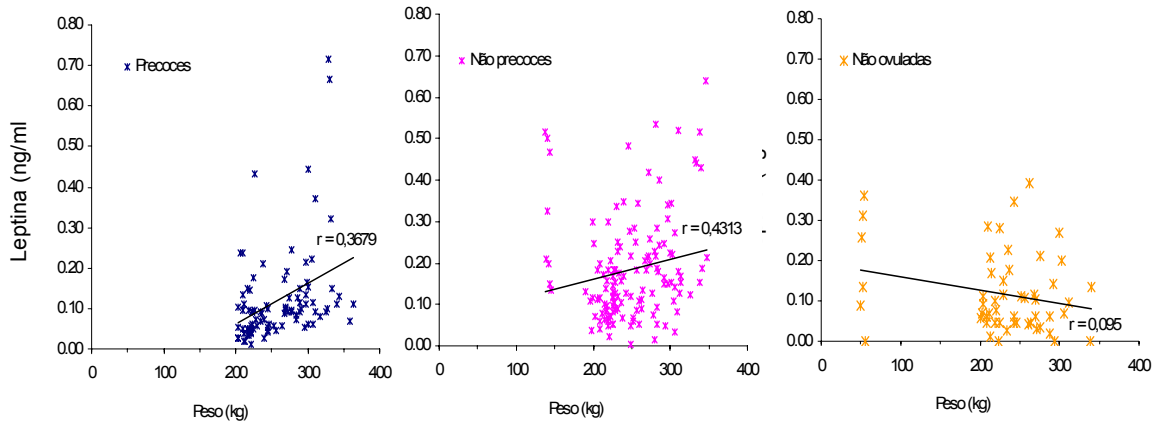

Figura 19**.** Correlação linear de Pearson entre a concentração de leptina plasmática (ng/ml) e o peso (kg) de novilhas Nelore Precoce (n=12), Não Precoce (n=18, considerando a prenhez aos 16 meses) e Não Ovuladas (n=6).

13.5 VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DO IGF-I PLASMÁTICO

13.5.1 De acordo com a idade em meses

Houve aumento de 120% ($P < 0,01$) na concentração do IGF-I plasmático dos 8 aos 16 meses, aumentando de 174,09±18,33 ng/ml para 383,01±36,31ng/ml (Figura. 20).

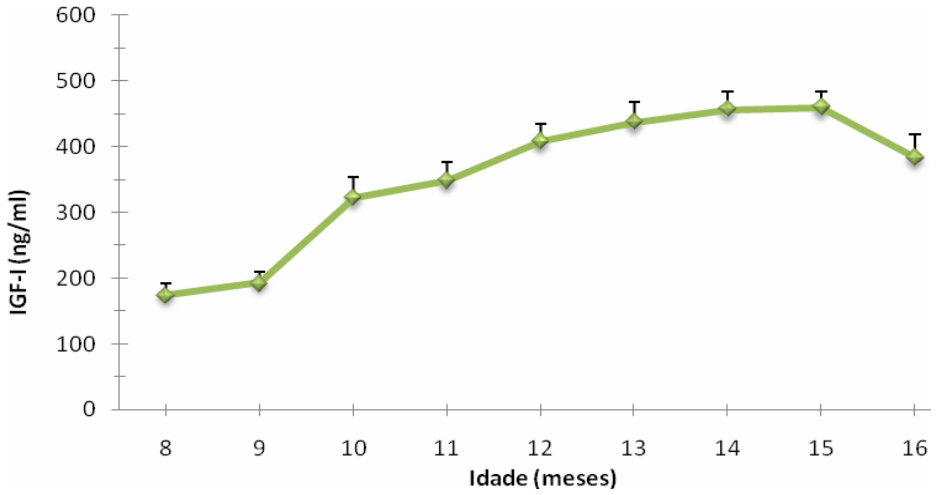

Figura 20 - Concentração de IGF-I plasmático (ng/ml; média ± EPM) em novilhas Nelore (n=36) de acordo com a idade em meses.

Houve aumento na concentração de IGF-I plasmático nos animais do grupo P (148,24%), NP (121,24%) e NO (110,51 %) do 8° ao 16° mês de idade. ($P < 0,01$). A concentração plasmática de IGF-I das novilhas P diferiu da concentração do IGF-I plasmático das novilhas NP e NO a partir do 12° mês de idade ($P < 0,01$; Figura. 21).

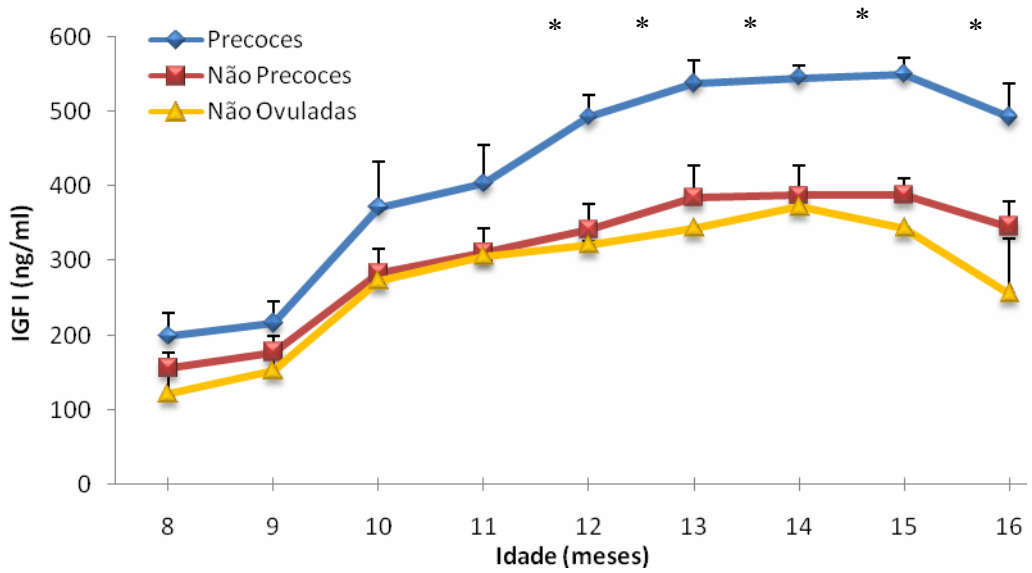

Figura 21 - Concentrações de IGF-I plasmático (ng/ml; médias ± EPM) em função da idade em meses, em novilhas Nelore ovuladas divididas de acordo com a precocidade (prenhez aos 16 meses) em Precoce (n=12), Não Precoce (n=18) e Não Ovuladas (n=6).

13.5.2 A cada 4 dias, 56 dias antes da primeira ovulação

Não encontramos diferença na concentração plasmática de IGF-I nos 56 dias que antecederam a primeira ovulação ao analisarmos as 36 novilhas em conjunto (*P* >0,1; Figura 22).

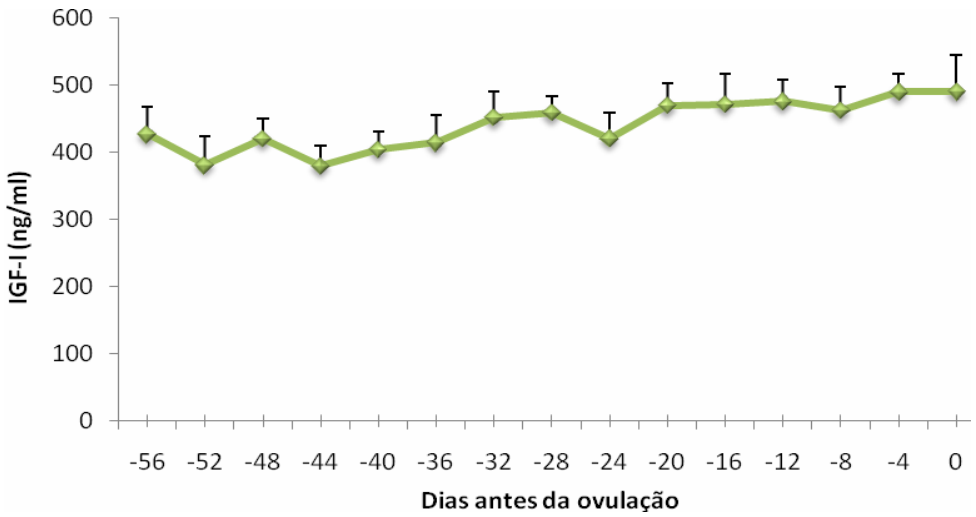

Figura 22 - Concentração plasmática de IGF-I (ng/ml; média ± EPM) em novilhas Nelore (n=36) em intervalos de 4 dias, 60 dias antes da primeira ovulação.

Nos 56 dias que precederam a primeira ovulação, a concentração plasmática do IGF-I nos animais P foi maior que a concentração de IGF-I plasmático nos animais NP e NO (*P* < 0,05), não havendo aumento significativo ao longo do tempo em nenhum dos grupos (*P* > 0,1; Figura. 23).

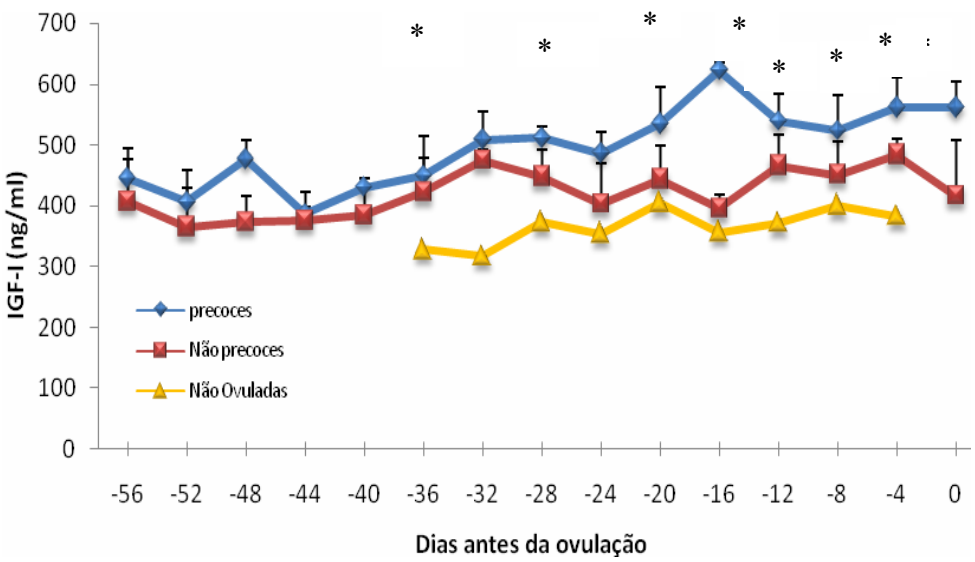

Figura 23 - Concentrações médias (ng/ml; média ± EPM) do IGF-I plasmático 56 dias antes da primeira ovulação em novilhas Nelore nos grupos Precoce (prenhes aos 16 meses de idade; n=12), Não Precoce (n=18) e Não Ovuladas (n=6).

13.6. CORRELAÇÃO ENTRE IGF-I PLASMÁTICO E PESO CORPORAL

Foi verificado correlação entre a concentração plasmática de IGF-I e o peso corporal, dos 8 aos 16 meses de idade, tanto no grupo P (r =0,3236; $P < 0,05$), quanto no grupo NP (r = 0,2476; $P < 0,05$). No entanto, nos animais NO não foi verificada correlação entre a concentração de IGF-I plasmático e o peso corporal (r=0,1878 e $P > 0,4$; Figura. 24).

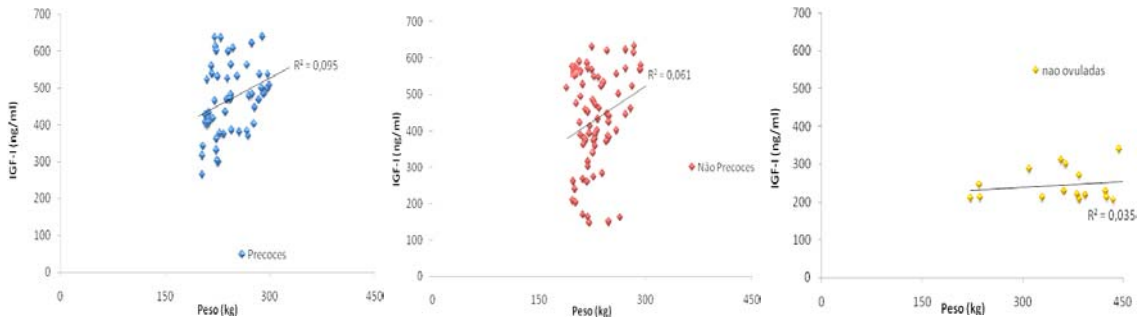

Figura 24. Correlação linear de Pearson entre a concentração de IGF-I plasmático (ng/ml) e o peso (kg) de novilhas Nelore Precoce (n=12), Não Precoce (n=18) e Não Ovuladas (n=6).

14 DISCUSSÃO

Antes do primeiro ciclo normal as novilhas costumam apresentar um ciclo curto (EVANS et al., 1994), sendo neste a duração na secreção de progesterona menor que em um ciclo normal. Em função do protocolo de colheita a cada 4 dias não foi possível identificar precisamente o dia do início do primeiro ciclo em todos os animais. Considerou-se uma elevação duas vezes maior que o coeficiente de variação intra-ensaio seguida de um aumento maior que 1 ng/ml na concentração de PROGESTERONA como sinalizando um ciclo curto antes de uma ovulação (OYEDIPE et al., 1986; WEHRMAN et al., 1996). Assim, o dia da ovulação foi identificado como a média do intervalo entre o dia do aumento da concentração de progesterona e o dia da quantificação anterior, em animais com ciclo curto.

O fato da novilha ovular mas não apresentar comportamento de estro, evento comum nos primeiros ciclos, impede que a mesma seja coberta e possa emprenhar. Portanto a exteriorização do cio, detectada pelo rufião, foi a condição necessária para a inseminação das novilhas.

A idade à primeira ovulação observada nas novilhas Nelore utilizadas neste experimento, 14,73±0,18 meses, foi inferior à idade média, entre 22 e 36 meses, para a puberdade do gado Zebu (SOUZA et al., 1995; ROMANO, 1997; RESTLE et al.,1999; PEREIRA, 2000). Como a idade à primeira ovulação em novilhas é regulada pelo consumo de energia, taxa de crescimento e quantidade de tecido adiposo (KINDER et al., 1987; WILLIAMS et al., 2002), pode-se inferir que a baixa idade à puberdade encontrada nos animais deste experimento seja conseqüência das condições nutricionais adequadas à que esses animais estavam submetidos e da seleção imposta ao rebanho para puberdade precoce, já que embora exista a dependência de uma idade e peso mínimo para a primeira ovulação na novilha, fatores genéticos e ambientais também influenciam a idade à puberdade (PATTERSON et al., 1992; ROCHA; LOBATO, 2002).

A antecipação da primeira ovulação para os 15 meses de idade, possibilita a antecipação do primeiro parto para 24 meses, o que confere o aumento na produtividade das novilhas (PATTERSON et al, 1992; SCHILLO et al.,1992), já que ao serem cobertas com cerca de um ano de idade, teriam a primeira cria próximo aos 2 anos, produzindo um bezerro a mais em toda sua vida, em comparação a novilhas com o primeiro parto aos 3 anos de idade (MARTIN et al., 1992; PATTERSON et al., 1992).

A genética dos animais, juntamente às boas condições nutricionais são importantes para determinar a eficiência das novilhas em ficarem prenhes aos 24 meses de idade (ROCHA; LOBATO, 2002), lembrando que as primíparas apresentam a categoria mais exigente do rebanho, já que além da função reprodutiva elas ainda estão em crescimento e muitas vezes em lactação, o que aumenta as exigências nutricionais. Portanto, o bom estado nutricional das fêmeas é fundamental para se atingir uma melhor taxa de prenhez (SPITZER et al., 1995).

A idade à puberdade, uma das características indicadoras da precocidade sexual dos bovinos, não diferiu entre as novilhas P e NP ($P > 0,05$). No entanto, houve diferença quanto a idade à prenhez. A redução da idade ao primeiro parto, o que os tornaria mais precoces, é um dos grandes desafios da pecuária nacional. Nas novilhas estudadas, 33,3% ficaram prenhes até os 16 meses de idade, sendo classificadas como P e 50% não ficaram prenhes até o final do experimento, sendo classificadas como NP.

A mensuração da taxa de prenhez por meio da idade à prenhez aos 16 meses é indicada, uma vez que esta característica apresenta variabilidade genética alta e deve responder eficientemente à seleção (SILVA; DIAS; ALBUQUERQUE, 2005).

O estabelecimento da precocidade requer que as novilhas possuam idade e peso adequado para que a maturação sexual ocorra, mas também necessitam de potencial genético para que característica, e para que a novilha zebuína possa expressar seu potencial genético é necessário que disponha de alimentação adequada e bom manejo sanitário. O nascimento em época do ano adequada e a exposição ao touro próximo ao período da puberdade (após os 12 meses) podem contribuir para antecipar a idade à puberdade. Uma boa técnica de manejo seria a utilização do estímulo do touro e selecionar as fêmeas prenhes até os 16 meses de idade, o que funcionaria como um bom critério de seleção e com alta herdabilidade.

Não foi verificada diferença no peso entre os grupos, desde o nascimento até a puberdade, sendo observado o peso médio à primeira ovulação de 298,4±3,86 kg para todas as novilhas, de 296,31±4,57 kg para as novilhas P e de 299,84±5,3 kg para as novilhas NP (Tab.1). Estes dados coincidem com as observações de Romano (1997) que encontrou peso médio à puberdade de 302±7,0 kg em novilhas Nelore, e também com outras fontes da literatura, que citam que o peso à primeira ovulação em novilhas Nelore varia de 300 a 330 kg (PATTERSON et al., 1992; CARRIJO e DUARTE, 1999; THALLMAN et al. ,1999; SEMMELMANN et al., 2001).

O ganho de peso diário após a desmama (Tab. 1), dos 8 meses até o final do experimento, aos 16 meses, foi menor ($P < 0,05$) nas NO (0,33±0,03 kg/dia) do que nas P (0,49±0,02 kg/dia) e NP (0,52±0,01kg/dia), sugerindo ser necessário um ganho de peso maior para que se inicie a puberdade. Em novilhas com ganho de peso pós desmama maiores que 0,4kg/dia, não foi verificado efeito da taxa de crescimento sobre o aparecimento da puberdade (WILTBANK et al., 1996). Além disso, o fato da novilha estar ganhando peso é importante, já que interfere na secreção de gonadotrofinas e no desenvolvimento folicular, alem da secreção de hormônios como IGF-I e leptina, participando do processo de maturação sexual das novilhas.

Nos 3 grupos foi verificado aumento de peso dos 8 aos 16 meses de idade (Fig.14) e a partir dos 12 meses de idade passou a ser verificada diferença no peso dos animais do grupo P e NP em relação ao NO. As novilhas P apresentaram maior ganho de peso aos 13 meses, antes das novilhas NP e NO, que o apresentaram aos 16 meses, podendo sugerir uma predisposição à fertilidade precoce. Estas observações coincidem com as de Restle et al. (1999) que observaram que fêmeas mais pesadas ao desmame e aos 12 meses foram mais precoces na manifestação da puberdade. Alencar et al. (1987) observaram que novilhas Nelore mais pesadas aos 12 meses de idade apresentaram cio primeiro.

Maior peso traduz maior deposição de gordura, que fornece substrato para a esteroidogênese e assim o desenvolvimento folicular. Animais com maior reserva de gordura corporal, supostamente submetidos à boas condições nutricionais, apresentam maiores concentrações de insulina, IGF-I e leptina no plasma (SCHRICK et al., 1990). Schillo (1992) indicou que uma maior ingestão de energia estimula a secreção de GnRH, o que por sua vez aumenta a síntese e liberação de LH.

O peso é um fator determinante para a maioria das modificações associadas com a primeira ovulação (FOSTER; NAGATANE, 1999; GARCIA et al., 2002), já que são necessários peso e condição corporal compatíveis com a maturidade sexual para que o hipotálamo das novilhas aumente a freqüência de pulsos de GnRH e determine a primeira ovulação (FERREL, 1991). Para que o hipotálamo reassuma a pulsatilidade e determine a secreção de LH levando à ovulação, há a necessidade da disponibilidade de energia metabólica, adquirida com o aumento das reservas de gordura, em conseqüência do crescimento das novilhas. O aumento no peso pode ser identificado pelo hipotálamo através do aumento da concentração da leptina (FOSTER; NAGATANI, 1999) e do IGF-I (JONES et al., 1991; ROBERTS et al., 1990) plasmáticos.

A leptina, sintetizada nos adipócitos (FRIEDMAN; HALAAS, 1998; ZHANG, et al., 1994), age como um sinal metabólico informando ao sistema nervoso central que existe reserva corporal suficiente para suprir as demandas do processo reprodutivo (BARASH et al., 1996). A concentração plasmática de leptina nas novilhas Nelore estudadas aumentou (Figura. 16; $P < 0,01$) do 8° ao 16° mês de idade, simultaneamente ao peso corporal nas novilhas P e NP, como o observado por Garcia et al. (2002) em novilhas cruzadas. Nas novilhas P e NP pode ser observado aumento no peso e na concentração de leptina a partir dos 12 meses de idade ($P < 0,01$).

O crescimento e o aumento do peso, que gerou o aumento da quantidade e tamanho dos adipócitos é certamente o responsável pelo aumento na concentração de leptina circulante durante o desenvolvimento puberal nos bovinos (DIAZ-TORGA et al., 2001; GARCIA et al., 2002), já que animais com boa condição corporal têm maior quantidade de gordura e conseqüentemente maior quantidade de leptina circulante (BLACHE et al., 2000; EHRHARDT et al., 2000). O aumento na gordura corporal pode ser traduzido em aumento na concentração de leptina plasmática através da hipertrofia dos adipócitos, de acordo com a correlação ($P < 0,01$) entre a leptina plasmática e o peso corporal nas novilhas P (r=0,3679) e NP (r=0,4313). Assim, a concentração de leptina seria um bom indicador da gordura corporal em ruminantes (CHILLIARD et al., 1998; DELAVAUD et al., 2000). Em novilhas que tiveram sua condição corporal prejudicada por parasitismo, foi verificado atraso de 10 semanas na aumento da leptina plasmática no período da puberdade (DIAZ-TORGA et al., 2001).

Entre o 14° e o 15° mês de idade, período em que ocorreu a primeira ovulação nas novilhas, foi também o momento de maior aumento no peso das novilhas P e NP, que ovularam. Nas novilhas NO, apesar do ganho de peso, não foi verificado aumento na concentração de leptina. Esse dado sugere que a leptina, juntamente ao peso corporal, foi importante na entrada na puberdade. A elevada concentração de leptina, em função da maior quantidade de gordura corporal, sinalizaria o SNC de que a novilha está em boas condições metabólicas e apta para manter uma prenhez, caso ocorra.

Acredita-se que os efeitos da leptina sobre a secreção de gonadotrofinas seja mediado, em parte, pelo neuropeptídio Y (NPY; KALRA; CROWLEY, 1992). Esse neuropeptídio, localizado no hipotálamo, tem a capacidade de estimular ou inibir a liberação de GnRH (KALRA; KALRA, 1996) em resposta às condições metabólicas do animal.

Terasawa e Fernandez, 2001 sugeriram ser o NPY um importante inibidor durante a pausa juvenil que antecede a entrada na puberdade, estando associado à ligação entre o

controle da alimentação e a secreção de GnRH. Assim, pode-se inferir que nas novilhas Nelore estudadas, a leptina produzida pelos adipócitos, sinalizaria positivamente que o animal possui reservas nutricionais adequadas para que a primeira ovulação ocorra, inibindo a secreção do NPY e assim indiretamente estimulando a liberação do GnRH.

Em novilhas pré-púberes sob boas condições nutricionais, o tratamento com leptina não teve efeito sobre a secreção de LH (MACIEL et al., 2004a; ZIEBA et al., 2004), se mostrando incapaz de acelerar o início da puberdade (MACIEL et al., 2004b). O efeito da administração de leptina sobre a secreção de LH somente pode ser notado em animais submetidos a restrição alimentar. Maciel et al. (2002a), não obtiveram aumento na amplitude dos pulsos de LH, mas sim a prevenção na redução da sua freqüência ao tratarem com leptina novilhas pré-puberes sob restrição alimentar.

Somente em animais adultos submetidos ao estresse nutricional, o tratamento com leptina tem se mostrado capaz de agir sobre o eixo reprodutivo central (AMSTALDEN, et al., 2002; ZIEBA et al., 2003; AMSTALDEN et al., 2003), ligando-se a receptores presentes tanto no hipotálamo, em áreas ricas em neurônios para o GnRH, tais como o núcleo arqueado, área pré-óptica e eminência média (CUNNINGHAN et al.,1999; JIN et al., 2000) quanto na hipófise, estimulando a liberação do LH (HENRY et al., 1999; MORRISON et al., 2002; MACIEL et al., 2004a; AMSTALDEN et al., 2005).

Nos 60 dias que precederam a primeira ovulação, não houve diferença na concentração de leptina entre as novilhas que ovularam, P e NP, e as NO ($P > 0,05$). O que se notou foi o aumento progressivo da concentração da leptina plasmática nos animais P, enquanto nos animais NP e NO não houve diferença (P > 0,5) com a aproximação da ovulação (Figura. 18).

Ao analisarmos a concentração plasmática de leptina com o avançar da idade (Figura. 16), encontramos maior concentração nos animais NP (0,19±0,01 ng/ml) que nos animais P (0,12±0,01 ng/ml; $P < 0,05$), o que mostra que provavelmente a concentração plasmática de leptina não teve ação sobre a prenhez desses animais. Talvez mais importante para essa característica tenha sido a forma da variação da concentração do hormônio, com progressivo aumento a partir dos 11 meses nas novilhas P. Em relação às NO, mesmo apresentando peso inferior ($P > 0,05$) às P, não houve diferença no valor médio da leptina, concordando que mais importante do que a quantidade desse hormônio é a forma como ele é liberado. O aumento da concentração da leptina plasmática sinaliza que o animal esta em boas condições metabólicas e apto a se reproduzir.

Assim, está claro que o aumento da concentração da leptina plasmática, um produto fisiológico do balanço energético positivo, ocorreu junto ao aumento no peso e parece que associados, a concentração plasmática de leptina e o peso corporal, podem ter influenciado a primeira ovulação de novilhas Nelore.

Apesar de relatos (YELICH et al., 1996; ROBERTS et al, 1990) de que o aumento na concentração de IGF-I plasmático em ruminantes seja um dos fatores responsáveis pelo o início da puberdade, por influenciar a secreção de gonadotrofinas (HINEY et al., 1991; 1996; PONS; TORRES ALEMAN 1993) e também através de suas relações com a atividade ovariana, de grande importância na precocidade sexual (SPICER; ECHTEMKAMP, 1995; CAMPBELL, 1999), não podemos afirmar que nas novilhas Nelore estudadas o IGF-I tenha sido determinante para o aparecimento da primeira ovulação, já que não foi verificada diferença (Figura 23; $P > 0,10$) na concentração plasmáticas entre as novilhas que ovularam P e NP, , e as NO nos 56 dias que precederam a ovulação.

O IGF-I plasmático pode não ter influenciado o momento da ovulação mas parece ter sido importante na determinação da prenhez, o que ficou claro na figura 21, onde observamos a diferença na concentração ($P > 0,10$) entre os animais do grupo P, que ficaram prenhes até o final do experimento, e os animais dos grupos NP e NO, que não emprenharam. Provavelmente a maior concentração de IGF-I plasmático nos animais P, teve ação direta no ovário ou útero, já que em um experimento anterior (de LUCIA, 2002) não foi observada diferença na concentração de LH entre novilhas precoces e não precoces.

O IGF-I pode atuar sobre os ovários, de maneira isolada ou sinergicamente às gonadotrofinas, afetando os folículos ovarianos (PELL; BATES, 1990). *In vitro,* os hormônios metabólicos sozinhos ou juntamente com gonadotrofinas afetaram diretamente os folículos ovarianos de roedores (HSUEH et al., 1984).

Elevadas concentrações de IGF-I foram associadas a maior estímulo folicular, aumentando o número de folículos recrutados, e atuando de maneira sinérgica às gonadotrofinas para estimular o crescimento folicular (LUCY et al., 2000).

O tratamento de fêmeas bovinas com r-bST aumentou o recrutamento de pequenos folículos através de aumentos no IGF-I e/ou insulina, que agem em sinergia com as gonadotrofinas (GONG et al., 1993; 1994). O tratamento de vacas com GH levou ao aumento nas concentrações circulantes de IGF-I, o que pode ter melhorado a função ovariana e uterina desses animais (BILBY et al., 1999).

A concentração plasmática do IGF-I, assim como a da leptina, é resultado do balanço energético positivo, e teve correlação com o peso corporal nos animais que ovularam P

(Figura. 24; $P < 0,05$) e NP ($P < 0,05$), mas não nas novilhas NO ($P > 0,4$). Essa correlação aconteceu provavelmente porque o peso, assim como a concentração de IGF-I aumentou nas novilhas P, NP e NO, dos 8 aos 16 meses de idade. Foi verificado por Yelich et al. (1996) que a concentração de IGF-I aumentou na circulação periférica de novilhas, próximo à puberdade, quando submetidas a maior ganho de peso comparadas com novilhas alimentadas para ganhar menos peso, que tiveram menores concentrações séricas de IGF-I e atrasaram a entrada na puberdade (YELICH et al., 1996). Correlação positiva entre IGF-I, insulina e ECC foi reportada anteriormente em novilhas e vacas de corte adultas (BISHOP et al., 1994; VIZCARRA et al., 1998).

A adequada condição nutricional também é responsável por maiores concentrações de glicose circulante, em função do aumento na secreção de insulina, capaz de suprir os nutrientes para a síntese de neurotransmissores que controlam a secreção de GnRH. A insulina pode atuar também diretamente nos ovários, aumentando a produção de progesterona (ROBINSON, 1990) e indiretamente, via elevação de GH e IGF-I, aumentando o *pool* folicular.

Animais sob boas condições nutricionais apresentaram elevadas concentrações plasmáticas de IGF-I (LUCY et al., 1992) e de insulina. Em geral, os efeitos da insulina nas células ovarianas são positivos, estimulando a proliferação das células da granulosa e a produção de progesterona. Estudos realizados com suínos, ovinos e bovinos demonstraram os efeitos estimulantes da insulina e IGF-1 na proliferação das células da granulosa e síntese de DNA (SPICER et al., 1993). Em bovinos,verificou-se que o IGF-1 além de estimular a proliferação mitótica das células da granulosa, aumenta a produção de esteróides por essas células, induzida pelo FSH (SPICER et al., 1993).

Como não houve diferença na idade à primeira ovulação, sendo 14,6 meses de idade para as novilhas P e 14,8 meses para as NP, não foi possível afirmar que os animais que entraram na puberdade primeiro foram mais precoces, já que não houve diferença na idade à puberdade. O que levou os animais a emprenharem primeiro, no caso das novilhas P pode ter sido o maior estímulo folicular causado pelo IGF-I após a entrada na puberdade. O que pode ser baseado em De Lucia et al. (2002), que observaram maior diâmetro folicular entre 12 e 14 meses em novilhas Nelore precoces, sendo que aos 12 meses verificou-se o inicio da diferenciação na concentração de IGF-I plasmático entre as novilhas que ficaram prenhes e as que não ficaram (Figura 21).

Como o IGF-I aumentou durante a puberdade, inferimos que ele provavelmente contribuiu para o processo de maturação sexual (HINEY, 1996), pois esteve relacionado à

parâmetros somáticos como o peso (PAO et al., 2003), atuando como indicador metabólico e sinalizando a leitura fisiológica para a maturação sexual (PONS; TORRES ALEMAN, 1993), no entanto não foi determinante para desencadear a ovulação. O modelo de liberação de IGF-I encontrado parece ter sido importante para a determinação da precocidade sexual nas novilhas Nelore.

15 CONCLUSÕES

1 O anticorpo anti *r-eLEP* produzido em coelho apresentou sensibilidade suficiente para detectar concentrações de leptina circulante no plasma bovino quantificadas pelo RIA

2 O ensaio para a quantificação de leptina plasmática bovina apresentou sensibilidade, especificidade, precisão e estabilidade, sendo considerado válido e com as características adequadas ao desenvolvimento de um RIA confiável.

3 A leptina participou do processo da puberdade das novilhas Nelore estudadas, juntamente com o peso, e o IGF-I se mostrou determinante no estabelecimento da prenhez.

REFERÊNCIAS

ADAM, C.L.; FINDLAY, P.A.; MOORE, A.H. Efects of insulin-like growth factor-1 on luteinizing hormone secretion in sheep. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 50, p. 45-56, 1998.

ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; WATT, R.G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. I. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biol.Reprod.**, v. 73, p. 918-926, 2005.

ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; D'ERCOLE, A.J.; SVOBODA, M.E.; VAN WYK, J.J. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. **Endocr. Rev.**, v. 6, p. 400–420, 1985.

AGUADO J.; RODRIGO J.; CACICEDO L.; MELLSTROM B. Distribution of insulin-like growth factor-l receptor mRNA in rat brain. Regulation in the hypothalamoneurohypophysial system. **J.Met.Endocrinol.,** v. 11, p. 231-239, 1989.

AHIMA R.S.; PRABAKARAN D.; MANTZOROS C.; QU D.; LOWELL B.; MARATOS-FLIER E; FLIER, F. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature,** v. 382, p. 250–252, 1996.

AHIMA, R.S.; DUSHAY, J.; FLIER, S.N.; PRABAKARAN, D.; FLIER, J.S. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. **J. Clin. Invest.**, v. 99**,** p. 391–395, 1997

ALENCAR, M.M.; COSTA J.L.; CORREA, L.A. Desempenho reprodutivo de fêmeas das raças canchim e nelore. **Pesq. Agropec., Bras.**, v. 22, n.7, p. 753-758, 1987.

AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Leptin gene expression, circulating leptin and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I. **Biol.Reprod.,** v. 63, p. 127-133, 2000.

AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; STANKO, R.L.; NIEZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 1555–1561, 2002.

AMSTALDEN, M.; ZIEBA, D.A.; EDWARDS, J.E.; HARMS, P.G.; WELSH, T.H.; STANKO, R.L.; WILLIAMS, G.L. Leptin acts at the bovine adenohypophysis to enhance basal and GnRH-mediated release of LH: differential effects are dependent upon nutritional history. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 1539–44, 2003.

AMSTALDEN, M.; HARMS, P.G.; WELSH JR, T.H.; RANDEL, R.D.; WILLIAMS, G.L. Effects of leptin on gonadotropin releasing hormone release from hypothalamic-infundibular explants and gonadotropin release from adenohypophyseal primary cell cultures: further evidence that normally-nourished cattle are resistant to leptin. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 85, p. 41–52, 2005.

ANDERSON, L.H.; McDOWELL, C.M.; DAY, M.L. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 1025-1031, 1996.

ANDERSON, R.A.; ZWAIN, I.H.; ARROYO, A.; MELLON, P.L.; YEN, S.S. The insulin like growth factor system in GT1-7cells. **Endocrinol.**, v. 70, p. 353-359, 1999.

BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J.P.; BORTOLUZZI, M.N.; MOIZO, L.; LEHY, T.; GUERRE-MILLO, M.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; LEWIN, M.J,M. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v. 394, p. 790–793, 1998.

BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S.; REN, H.; KABIGTING, E.B.; KUIJPER, J.L.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinol.**, v. 137, p. 3144-3147, 1996.

BARNES, M.A.; BIERLEY, S.T.; HALMAN, R.D.; HENDRICKS, D.M. Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and estradiol-17 beta response in GnRH treated prepubertal Holstein heifers. **Biol. Reprod.**, v. 22, p. 459-465, 1980.

BELOSO, E.S.; IGLESIA, R.L.; GUVARA, L.; CASTILLO, G.S. Bull effect on the reproductive performance of the mature and first-suckled zebu cows in the tropics. **Theriogenol.,** v. 48, p.1185-1190, 1997.

BERGFELD, E.G.M.; KOJIMA, F.N.; CUPP, M.E.; PETERS, K.E.; GARCIA-WINDER, M.; INDER, J.E. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. **Biol. Reprod.**, v. 51, p. 1051-1057, 1994.

BERGMANN, J.A.G. Melhoramento genético da eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1993, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1993.p. 70-86. (Suplemento).

BERGMANN, J.A.G.; ZAMBORLlNI, L.C.; PROCÓPIO, C.SO.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R. Estimativas de PARÂMETROS genéticos do perímetro escrotal e do peso corporal em animais da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet Zootec.**,v .48, n.1, p. 69-78, 1996.

BERGMANN, J.A.G. Indicadores de Precocidade Sexual em Bovinos de Corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS, 1998, Uberaba. **Anais...** Uberaba: Associação Brasileira dos Criadores de Zebu, 1998, p. 145-155.

BILBY, C.; BADER, J.; SALFEN, B.; YOUNGQUIST,R.; MURPHY,C.; GARVERICK, H.; CROOKER, B.; LUC, M. Plasma GH, IGF-I, and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. **Theriogenol.**, v. 51, n°7, p. 1285-1296, 1999.

BISHOP, D. K.; WETTEMANN, R. P.; SPICER, L. J. Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. **J. Anim. Sci.** v. 72, p. 2703–2708, 1994.

BLACHE D.; TELLAM, R.L.; CHAGAS, L.M.; BLACKBERRY, M.A.; VERCOE, P.E.; MARTIN, G.B. Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. **J. Endocrinol.,** v. 165, p. 625-637, 2000.

BLOCK, S. S.; BUTLER, W. R.; EHRHARDT, R. A.; BELL, A. W.; VAN AMBURGH, M. E.; BOISCLAIR, Y. R. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. **J. Endocrinol**., v. 171, p. 339–348, 2001.

BOHANNON, N.J.; FIGLEWICZ, D.P.; CORP, E.S.; WILCOX, J.; PORTE JR, D.; BASKIN D.G.;Identification of binding sites for an insulin-like growth factor (IGF-I) in the median eminence of the rat brain by quantitative autoradiography. **Endocrinol.,** v. 119, p. 943-945, 1986.

BOUKHLIQ, R.; MARTIN, G.B. Administration of fatty acids and gonadotrophin secretion in the mature ram. **Anim. Reprod. Sci.,** v. 49, p**.** 143–159, 1997.

BOURGUIGNON, J.P.; GERARD, A.; GONZALEZ, M.A.; FRANCHIMONT, P. Acute suppression of GnRH secretion by insulin-like growth factor 1 and subproducts: an age-dependent endocrine effect. **Neuroendocrinol.**, v. 58, p. 525-530, 1993.

BRONSON, F.H. Food restricted, prepubertal female rats: rapid recovery of luteinizing hormone pulsing with excess food, and full recovery of pubertal development with gonadotropin releasing hormone. **Endocrinol.,** v**.** 118, p. 2483-2487, 1986.

BRONSON, F.H.; MANNING, J.M. The energetic regulation of ovulation: a realistic role for body fat. **Biol.Reprod.,** v. 44, p. 945-950, 1991.

CAMPBELL, B.K. The modulation of gonadotrophic hormone action on the ovary by parácrino and autocrine factors. **Anat. Histol. Embryo1.**, v. 28, p. 247-251, 1999.

CAMPFIELD, L.A.; SMITH, F.J.; GUISEZ, Y.; DEVOS, R.; BURN, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science,** v**.** 269, p. 546–549, 1995.

CARATY, A.; FABRE-N,Y.S.C.; DELALEU B.; LOCATELLI, A.; BRUNEAU, G.; KARSCH, F.J.; HERBISON. A Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in the ewe. **Endocrinol.,** v. 139, p. 1752-1760, 1998.

CHEHAB, F.F.; MOUNZIH, K.; LU, R.; LIM, M.E. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. **Science**, v. 275, p. 88-90, 1997.

CHELIKANI, P.K.; GLIMM, D.R.; KENNELLY, J.J. Short communication: tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. **J Dairy Sci,** v. 86, p. 2369–2372, 2003.

CHEUNG, C.C.; THORNTON, J.E.; KUIJPER, J.L.; WEIGLE, D.S.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. **Endocrinol.,** v. 138, p. 855-858, 1997.

CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DELAVAUD, C.; GUERRE-MILLO, M.; BONNET, M.; MARTIN, P.; FAULCONNIER, Y.; FERLAY, A. Leptin in ruminants: effects of species, breeds, adiposity, photoperiod, beta-agonists and nutritional status. In: *60th Cornell Nutrition Conference, Proceedings.* **v.60, p. 65–74, 1998.**

CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C.; FAULCONNIER, Y.; LEROUX, C.; DJIANE, J.; BOCQUIER, F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domest Anim Endocrinol**., v. 21, p. 271–295, 2001.

CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. **Cytokine Growth Factor Rev**., v. 8, p.45–62, 1997.

COHEN, S.L.; HALAAS, J.L.; FRIEDMAN, J.M.; CHAIT, B.T. Human leptin characterization. **Nature**, p. 382:589, 1996.

CROUCH, J.S.; SMITH, T.R. Detection and identification of the leptin binding protein in dairy cattle. **FASEB J**; v. 18:A1228, 2004.

COUSE, J.F.; KORACH, K.S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? **Endocr Rev**., v. 20, p. 358-417,1999.

CUNNINGHAM, M.J.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biol Reprod., v.** 60, p. 216–222, 1999.

DARENDELILER, F.; HINDMARSH, P. C.; PREECE, M. A.; COX, L.; BROOK, C.G.D. Growth hormone increases rate of pubertal maturation. **Acta Endocrinol** (Copenh), v. 122, n. 03, p. 414-6, 1990.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; GARCIA-WINDER, M.; ZALESKY, D.D.; SCHANBACHER, B.D.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers – estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biol.Reprod.,** v. 31, p. 332-341, 1984.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; ZALESKY, D.D.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Effects of restriction of dietary energy intake during the prepuberal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone in heifers. **J.Anim.Sci.,** v. 62, p. 1641, 1986.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion**. Biol Reprod**, v. 37, p. 1054-1065, 1987.

DBO, ANUÁRIO 2005. **Revista DBO**, São Paulo, n.292, p. 5-38, 2005.

DELAVAUD, C.; BOCQUIER, F.; CHILLIARD, Y.; KEISLER, D.H.; GERTLER, A.; KANN, G. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. **J.Endocrinol.,** v. 165, p. 519-526, 2000.

DELAVAUD, C.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y.; BOCQUIER, F.; KANN, G.; CHILLIARD, Y. Plasma leptin concentration in adult cattle: Effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. **J. Anim. Sci**., v. 80, p. 1317–1328, 2002.

de LUCIA, R.F.S.; PEREIRA, F.V.; NOGUEIRA, G.P.; Follicular population in precocious and non precocious Nelore heifers during prepubertal period. **Theriogenol**., v. 57 (Suppl. 1), p. 603. 2002.

DIAZ-TORGA, G.S.; MEIJA, M.E.; GONZÁLEZ-IGLESIAS, A.; FORMIA, N.; BECÚ-VILLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I.M. Metabolic cues for puberty onset in free-grazing Holstein heifers naturally infected with nematodes. **Theriogenology**, v. 56, p. 111-122, 2001.

DIANO S.; KALRA, S.P.; SAKAMOTO, H.; HORVATH, T.L.; Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. **Brain Res.,** v. 812, p. 256-259, 1998.

DOBSON, H.; KAMONPATANA, M. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu. **J. Reprod. Fert.**, v. 77, p. 1-36, 1986.

DUENAS, M.; TORRES-ALEMAN, I.; NAFTOLIN, F.; GARCIA SEGURA, L.M. Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal diferentiation. **Neuroscience**, v. 74, p. 531-539, 1996.

EBLING, F.J.P.; WOOD, R.I.; KARSCH, F.J.; VANNERSON, L.A.; SUTTIE, J.M.; BUCHOLTZ, D.C.; SCHALL, R.E.; FOSTER, D.L. Metabolic interfaces between growth and reproduction: III. Central mechanisms controlling pulsatile LH secretion in the nutritionally growth-limited female lamb. **Endocrinol.,** v. 126, p. 2719-2727, 1990.

EHRHARDT, R.A.; SLEPETIS, R.M.; SIEGAL-WILLOTT, J.; VAN AMBURGH, M.E.; BELL, A.W.; BOISCLAIR, Y.R. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. **J. Endocrinol.,** v. 166, p. 519-528, 2000.

EHRHARDT, R.A.; BELL, A.W.; BOISCLAIR, Y.R. Spatial and developmental regulation of leptin in fetal sheep. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** v. 282, p. R1628–1635, 2002.

ELER, J.P.; SILVA, J.A.IIV.; FERRAZ, J.B.S.; DIAS, F.; OLIVEIRA, H.N.; EVANS, J.L.; GOLDEN, B.L. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. **J.Anim. Sci.**, v.80, p. 951-954, 2002.

ELMQUIST, J.K.; BJORBAEK, C.; AHIMA, R.S.; FLIER, J.S. Distributions of leptin receptor isoforms in the rat brain. **J. Comp. Neurol**, v. 395, p. 535–547, 1998.

EMILSSON, V.; LIU, Y.L.; CAWTHORNE, M.A.; MORTON, N.M.; DAVENPORT, M. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. **Diabetes**, v. 46, p. 313–316. 1997.

EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepuberal heifers. **J.Reprod.Fertil.,** v. 100, p. 187-194, 1994.

FERREIRA, V.L.M. O radioimunoensaio. Belo Horizonte, cultura médica, 1983, p. 69-81.

FERREL, C.L. Nutritional influences on reproduction. *In*: Cupps, P.T. **Reproduction in Domestic Animal.**.4° ed, Academic Press, p: 577-603. 1991.

FLIER, J.S. Leptin expression and action: new experimental paradigms. ***PNAS,*** v.94, p. 4242–4245, 1997.

FRIEDMAN, G.C.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of the body weight in mammals. **Nature,** v. 395, p. 763-770. 1998.

FORS, H.; MATSUOKA, H.; BOSAEUS, I.; ROSBERG, S.; WIKLAND, K.A.; BJARNASON, R. Serum leptin levels correlate with growth hormone secretion and body fat in children. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, p. 3586-90, 1999.

FOSTER, D.L.; OLSTER, D.H. Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: patterns of tonic luteinizing hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. **Endocrinol.**, v. 116, p. 375–381, 1985.

FOSTER, D.L.; NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. **Biol. Reprod**., v. 60, p. 205–215, 1999.
FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature,** v. 395, p. 763–770, 1998.

GALINA, C.S.; ARTHUR, G.H. Review of cattle reproduction in the tropics. Part 1. Puberty and age at first calving. **Anim. Breed. Abstr.**, v. 57, n.7, p. 583-590, 1989.

GARCIA, M.R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S.W.; JOHNSON, C.D.; NIZIELSKI, S.E.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Leptin and pubertal development in heifers: relationship of ob gene expression to circulating leptin as measured by heterologous radioimmunoassay. **Biol. Reprod**., v. 60 (Suppl. 1), p. 253 (Abstr.), 1999.

GARCIA, M.R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; NIZIELSKI, S.E.; WILLIAMS, G.L. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **J.Anim.Sci.,** v. 60, p. 2158-2167, 2002.

GERTLER, A.; SIMMONS, J.; KEISLER, D.H. Large-scale preparation of biologically active recombinant ovine obese protein (leptin). **FEBS Letters,** v. 422**,** p. 137–140, 1998.

GLASS, A.R.; HARRISON, R.; SWERDLOFF, R.S. Effect of undernutrition and amino acid deficiency on the timing of puberty in rats. **Pediatr. Res.**, v. 10, p. 951-955, 1976.

GOLDSMITH, S.J. Radioimmunoassay: review of basic principles. Seminars in Nuclear Medicine, v. 5, n.2, p. 125-152, 1975.

GONG, J.G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T.A.;WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. **J. Endocrinol**, v. 139, p. 67–75, 1993.

GONG, J.G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. **J. Endocrinol.**, v. 143, p. 157–164, 1994.

GUI, Y.; SILHA, J.V.; MISHRA, S.; MURPHY, L.J. Changes in adipokine expression during food deprivation in the mouse and the relationship to fasting-induced insulin resistance. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 81, p. 979– 85, 2003.

GRESSLER, S.L.; BERGMANN, J.A G.; PENNA, V.M.; PEREIRA, C.S.; PEREIRA, J.C.C. Estudo das associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 358, Botucatu, SP, 1998. Anais. SBZ, Botucatu, SP, v. 3, p. 368 370.

HALAAS, J.; GAJIWALA, K.; MAFFEI, M.; COHEN, S.; CHAIT, B.; RABINOWITZ, D.; LALLONE, R.; BURLEY, S.; FRIEDMAN, J. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v. 269, p. 543-546, 1995.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies. A laboratory manual.. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY, USA. 1988. 726 p.

HAVEL, P.J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes**, v. 53 (Suppl 1), p. 143–151, 2004.

HENRY, B.A.; GODING, J.W.; ALEXANDER, W.S.; TIBROOK, A.J.; CANNY, B.J.; DUNSHEA, F.; RAO, A.; MANSELL, A.; CLARKE, I.J. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. **Endocrinol.**, v. 140, p. 1175–1182, 1999.

HENRY, B.A.; TILBROOK, A.J.; DUNSHEA, F.R.; RAO, A.; BLACHE, D.; MARTIN, G.B.; CLARKE, I.J. Long-term alternations in adiposity affect the expression of melanin-concentrating hormone and enkephalin but not proopiomelanocortin in the hypothalamus of ovariectomized ewes. **Endocrinol.**, v. 141, p. 1506–1514, 2000.

HENRY, B.A.; GODING, J.W.; TILBROOK, A.J.; DUNSHEA, F.R.; CLARKE, I.J. Intracelebroventricular leptin infusion elevates the secretion of luteinizing hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of body weight. **J. Endocrinol,** v. 168, p. 67–77, 2001.

HILL, I. D. Reprodução com metas de precocidade marca o programa da Jacarezinho. **Pec. Corte**, p. 19-26. 1998.

HILL, R.A.; MARGETIC, S.; PEGG, G.G.; GAZZOLA, C. Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord,** v. 22, p. 765–770, 1998.

HINEY, I.K.; OJEDA, S.R.; DEES, W.L. Insulin-like growth factor-l: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. **Neuroendocrinol.,** v. 54, p. 420-423, 1991.

HINEY, J.K.; SRIVASTAVA, V.; NYBERG, C.L.; OJEDA, S.R.; DEES, W.L. Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. **Endocrinol.,** v. 137, p. 3717-3728, 1996.

HOCKFIELD, S.; CARLSON, S.; EVANS, C.; LEVITT, P.; PINTAR, J.; SILBERSTEIN, L. Selected methods for antibody and nucleic acid probes. **Cold Spring Harbour Laboratory Press**, v. 1, p. 459-501, 1993.

HONARAMOOZ, A.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. Effects of seasonof birth on the prepubertal pattern of gonadotropin secretion and age at puberty in beef heifers. **Theriogenol.**, v. 52, p. 67-79, 1999.

HONARAMOOZ, A.; ARAVINDAKSHAN, J.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON,R.A.; RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 80, n°1, p. 15-29, 2004.

HOPPER, H.W.; SILCOX, R.W.; BYERLEY, D.J.; KISER, T.E. Follicular development in prepubertal heifers. **Anim. Reprod. Sci**., v. 31, p. 7-12, 1993.

HÖTZEL, M.J.; WALKDEN-BROWN, S.W.; BLACKBERRY, M.A.; MARTIN, G.B. The effect of nutrition on testicular growth in mature Merino rams involves mechanisms that are independent of changes in GnRH pulse frequency. **J. Endocrinol.,** v. 147, p. 75–85, 1995.

HOUSENKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. **Dom. Anim. Endocrinol., v.** 15, p. 457–475, 1998.

HSUEH, A.J.W.; ADASHI, E.Y.; JONES, P.B.C.; WELSH, T.H.J. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. **Endocr. Rev.**, v. 5, p: 76–127, 1984.

JIN, L.; ZHANG, S.; BURGUERA, B.G.; COUCE, M.E.; OSAMURA, R.Y.; KULIG, E.; LLOYD, R.V. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. **Endocrinol., v.** 141, p. 333–339, 2000.

JONES, E.J.; ARMSTRONG, J.D.; HARVEY, R.W. Changes in metabolites, metabolic hormones, and luteinizing hormone before puberty in Angus, Braford, Charolais, and Simmental heifers. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p. 1607-1612, 1991.

KALRA, S.P.; CROWLEY, W.R. Neuropeptide Y: a novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to lutein zing hormone. **Front Neuroendocrinol.,** v. 13, p. 1–46, 1992.

KALRA SP. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. **Endocr Rev,** v. 14, p. 507-538, 1993.

KALRA, S.P.; KALRA, P.S. Nutritional infertility: the role of the interconnected hypothalamic neuropeptide Y-galanin-opioid network. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 17, p. 371-401, 1996.

KALRA, S.P.; DUBE, M.G.; PU, S.; XU, B.; HORVATH, T.L.; KALRA, P.S. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocr. Rev.,** v. 20, p. 68–100, 1999.

KANEMATSU, T.; IRAHARA, M.; MIYAKE, T.; SHITSUKAWA, K.; AONO, T. Effect of insulin like growth factor I on gonadotropin release from the hypothalamus-pituitary axis in vitro. **Acta endocrinol.**, v. 125, p. 227-233, 1991.

KARLSSON, C.; LINDELL, K.; SVENSSON, E.; BERGH, C.; LIND, P.; BILLIG, H.; CARLSSON, L.M.S.; CARLSSON, B.R.N. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. **J.Clin.Endocrinol.Metab.,** v. 82, p. 4144–4148, 1997.

KATZ, E.; RICCIARELLI, E.; ADASHI, E.Y. The potential relevance of growth hormone to female reproductive physiology and pathophysiology. **Fertil. Steril.**, v. 59, p. 8–34, 1993.

KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Perception and interpretation of the effects of undernutrition on reproduction. **J.Anim.Sci**., v. 74, p. 1-17, 1996. Supplemento 3.

KINDER, J.E.; DAY, M.L.; KITTOCK, R.J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **J.Reprod.Fertil.,** p. 167-186, 1987. Supplemento 34.

KITAWAKI, J.; KOSHIBA, H.; ISHIHARA, H.; KUSUKI, I.; TSUKAMOTO, K.; HONJO, H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. **J**. **Clin. Endocrinol. Metab.,** v. 85, p. 1946–1950, 2000.

LAGE, M.; GARCIA-MAYOR, R.V.; TOME, M.A.; CORDIDO, F.; VALLE-INCLAN, F.; CONSIDINE, R.V.; CARO, J.F.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F. Serum leptin in women throughout pregnancy and the postpartum period and in women suffering spontaneous abortion. **Clinical Endocrinol.,** v. 50, p. 211–216, 1999.

LACKEY, B.R.; GRAY, S.L.; HENDRICKS, D.M. The insulin-like growth factor (IGF) system on gonadotropin regulation: actions and interactions. **Cytocine Groth Factor Rev.**, v. 20, p. 201-217, 1999.

LEE, G.; PROENÇA, R.; MONTEZ, J.; CARROL, K.; DARVISHZADEH, J.; LEE, J.; FRIEDMAN, J. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v. 379, p. 632-635, 1996.

LEBRETHON, M.C.; VANDERSMISSEN, E.; GERARD, A.; PARENT, A.S.; JUNIEN, J.L.; BOURGUIGNON, J.P. In vitro stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms. **Endocrinol.**, v. 141, p. 1464–1469, 2000.

LESMEISTER, J.L.; BURFENING, P.J.; BLACKWELL, R.L. Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. **J.Anim.Sci**., v. 36, p. 1-6, 1973.

LESNIAK, M.A.; HILL, J.M.; KIESS, W.; ROJESKI, M.; CANDACE, B.P.; ROTH, J. Receptors for insulin-like growth factors I and II: autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptor for insulin. **Endocrinol.**, v. 123, p. 2089-2099, 1988.

LEURY, B.J.; BAUMGARD, L.H.; BLOCK, S.S.; SEGOALE, N.; EHRHARDT, R.A.; RHOADS, R.P.; BAUMAN, D.E.; BELL, A.W.; BOSCLAIR, Y.R. Effect of insulin and growth hormone on plasma leptin in periparturient dairy cows. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 285, p. R1107–R1115, 2003.

LI, H.; MATHENY, M.; TÜMER, N.; SCARPACE, P.J.; Aging and fasting regulation of leptin and hypothalamic neuropeptide Y gene expression. **Am. J. Physiol.,** v. 275, p. E405-411, 1998.

LICINIO, J.; NEGRÃO, A.B.; MANTZOROS, C.; KAKLAMANI, V.; WONG, M.L.; BONGIORNO, P.B.; MULLA, A.; CEARNAL, L.; VELDHUIS, J.D.; FLIER, J.S.; MCCANN, S.M.; GOLD, P.W. Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. ***PNAS,*** v. 95, p. 2541–2546, 1998.

LOBO, R.B.; FERNANDEZ, M.B.; MAFFEI, W.E.; BEZERRA, L.A.; LOBO, M.P.; GAVIO, D.; RIBEIRO, L.B. Estudo preliminar da mensuração do perímetro ovariano em bezerras da raça Nelore participantes do PMGRN. **Rev.Bras.Reprod.Anim.**,v. 25, n.2, p.127-128, 2001.

LOOPER, M.L.; BIZCARRA, J.A.; WETTEMANN, R.P.; MALAYER, J.R.; BRADEN, T.D.; GEISERT, R.D.; MORGAN, G.L. Influence of estradiol, progesterone, and nutrition on concentrations of gonadotropins and GnRH receptors, and abundance of mRNA for GnRH receptors and gonadotropin subunits in pituitary glands of beef cows. **J Anim Sci.,** v. 81, p. 269-278, 2003.

LUCY M.C.; BECK, J.; STAPLES, C.R.; HEAD, H.H.; De La SOTA R.L.; THATCHER, W.W. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin like growth factor I (IGF-I) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 23, p. 331-341, 1992

MACIEL, M.N.; ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; KEISLER, D.H.; NEVES, J.; WILLIAMS, G.L. Leptin prevents fasting-mediated reductions in pulsatile secretion of luteinizing hormone and enhances its GnRH-mediated release in peripubertal heifers. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 229–235, 2004a.

MACIEL, M.; ZIEBA, D.; AMSTALDEN, M.; KEISLER, D.; NEVES, J.; WILLIAMS, G.; Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. **J. Anim. Sci.,** v. 82, p. 2930-2936, 2004b.

MACKINNON, M.J.; TAYLOR, J.F.; HETZEL, D.J.S. Genetic variation and covariation in beef cow and bull fertility. **J. Anim. Sci**. v. 68, p. 1208-1214, 1990 .

MAFFEI, M.J.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R.E.; LEE, G.M.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, S.; RANGANATHAN, S.; KERN, P.A.; FRIEDMAN, J.M. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob mRNA in obese and weight-reduced subjects. **Nat. Med**., v. 1, p. 1155–1161, 1995.

MARKS, J.L.; PORTE, J.R.D.; BASKIN, D.G. Localization of type 1 insulin-like growth factor receptor messenger RNA in the adult rat brain by in situ hybridization. **Mol. Endocrinol.**, v. 5, p. 1158-1168, 1991.

MARTIN, L.C.; BRINKS, J.S.; BOURDON, R.M.; CUNDIFF, L.V. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. **J. Anim. Sci.,** v. 70, p. 4006-4017, 1992.

MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; SAGAWA, N.; HOSODA, K.; MATSUMOTO, T.; MISE, T.; NISHIMURA, H.; YOSHIMASA, Y.; TANAKA, I.; MORI, T.; NAKAO, K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nat. Med.**, v. 3, p**.** 1029–1033, 1997.

MATTOS, S.; ROSA, AN. Desempenho reprodutivo de fêmeas de raças zebuínas. Inf. Agropec. v. 10, n. 112, p. 29 33 1984.

MACNEIL, M.D.; CUNDIFF, L. V.; DINKEL, C. A.; KOCH, R M. Genetic correlations among sex-limited traits in beef cattle. **J. Anim. Sci**., v. 58, p. 1171, 1984.
MEACHAM, N.S.; NOTTER, D.R. Heritability estimates for calving date in simmental cattle. **J. Anim. Sci.,** v. 64, p. 701-705, 1987.

MEIRELLES, S.L. Efeitos genéticos e ambientais sobre características de precocidade sexual em bovinos Nelore. 2004.74f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2004.

MERCADANTE M. E. Z.; PACKER I. U.; RAZOOK A G.; CYRILLO J. N. S. G.; FIGUEIREDO L. A. Direct and correlated responses to selection for yearling weight on reproductive performance of Nelore cows. **J. Anim. Sci**., v. 81, p. 376-384, 2003

MERRY, B.J.; HOLEHAN, A.M. Onset of puberty and duration of fertility in rats fed a restricted diet. **J. Reprod. Fertil.**, v. 57, p. 253-259, 1979.

MEYER, K.; HAMMONO, K.; PAMELL, P.F.; MACKINNON, M. J.; SIVARAJASINGAM, S. Estimates of heritability and repeatability for reproduetive traits in Australian beef cattle. **Liv. Prod. Sci**., v. 25, p. 15-30, 1990.

McSHANE, T.M.; MAY, T.; MINER, J.L.; KEISLER, D.H. Central actions of neuropeptide-Y may provide a neuromodulatory link between nutrition and reproduction. **Biol. Reprod.,** v. 46, p. 1151-1157, 1992.

MILAZOTTO, M.P.; PERRI, S.H.; CAMPAGNARI, F.; GARCIA, J.F. Genetic analysis of early puberty phenotype in Bos primigenius indicus. **Theriogenol.**, v. 57, n.1, p. 613, 2002.

MILLER, D.W.; BLACHE, D.; MARTIN, G.B. The role of intracerebral insulin in the effect of nutrition on gonadotrophin secretion in mature male sheep. **Journal of Endocrinol.,** v. 147, p. 321–329, 1995.

MILLER, D.W.; BLACHE, D.; BOUKHLIQ, R.; CURLEWIS, J.D.; MARTIN, G.B. Central metabolic messengers and the effects of diet on gonadotrophin secretion in sheep. **J. Reprod. Fertil.,** v. 112, p. 347–356, 1998.

MIZUNO, T.; BERGEN, H.; KLEOPOULOS, S.; BAUMAN, W.A.; MOBS, C.V. Effects of nutritional status and aging on leptin gene expression in mice: importance of glucose. **Horm.Metab.Res.,** v. 28, p. 679-684, 1996.

MORAN, C.; QUIRKE, J.F.; ROCHE, J.F. Puberty in heifers: a review. **Anim. Reprod. Sci.,** v. 18, p. 167-182, 1989.

MORASH, B.; LI, A.; MURPHY, P.R.; WILKINSON, M.; UR, E. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. **Endocrinol.**, v. 140, p. 5995–5888, 1999.

MORRISON, C.D.; DANIEL, J.A.; HOLMBERG, B.J.; DJIANE, J.; RAVER, N.; GERTLER, A.; KEISLER, D.H. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. **J Endocrinol.,** v. 168, p. 317–324, 2001.

MORRISON, C.D.; WOOD, R.; MCFADIN, E.L.; WHITLEY, N.C.; KEISLER, D.H. Effect of intravenous infusion of recombinant ovine leptin on feed intake and serum concentrations of GH, LH, insulin, IGF-I, cortisol, and thyroxine in growing prepubertal ewe lambs. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 22, p. 103–112, 2002.

MOUDGAL, N.R.; MADHWA RAJ, pituatary gonadotrophins. In Jaffe B.M. e Behrman, H. (eds): Methods of hormone radioimmunoassay . Academic Press, New York, 1974, p. 57-85.

MUKASA MUGUERWA, E. A review of reproductive performance of female Bos indicus (zebu) cattle. **ILCA- Monograph**, no.6, v.134, p. 1989.

NAGATANI, S.; ZENG, Y.; KEISLER, D.H.; FOSTER, D.L.; JAFFE, C.A. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. **Endocrinol.,** v. 141, p. 3965–3975, 2000.

NAKADA, K.; ISHIKAWA, Y.; NAKAO, T.; SAWAMUKAI, Y. Changes in responses to GnRH on luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion in prepubertal heifers. **J. Reprod. Dev.,** v. 48, p. 545-551, 2002.

NETT, T.M.; TURZILLO, A.M.; BARATTA, M.; RISPOLI, L.A. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v 23, p. 33-42, 2002.

NOGUEIRA, G.P. Puberty in south American Bos indicus (Zebu) cattle. **Anim. Reprod. Sci.,** v. 82–83, p. 361–372, 2004.

OWENS, F.N.; DUBESKI, P.; HANSONT, C.F. Factors that Alter the Growth and Development of Ruminants. **J. Anim. Sci**. v. 71, p. 3138-3150,1993.

PAO, C.I.; FARMER, P.K.; BEGOVIC, S.; VILLAFUERTE, B.C.; WU, G.; ROBERTSON, D.G.; PHILLIPS, L.S. Regulation of Insulin-Like Growth Factor-l (IGF-I) and IGF-Binding Protein 1 Gene Transcription by Hormones and Provision of Amino Acids in Rat Hepatocytes. **Mol. Endo**., v. 7, n°12, p. 1561-1568, 1993.

PARKER, C.W. Nature of immunological responses and antigem-antibody interaction, in Odell W.D., Daughaday W.H. (eds): Principles of Competitive Protein-binding Assays. Philadelphia, J.B.Lippincott, 1971.

PARKER, C.W. Radioimunoassay. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. v. 21, p. 113-132, 1981.

PATTERSON, D.J.; PERRY, R.C.; KIRACOFE, G.H.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; CORAH, L.R. Management considerations in heifer development and puberty. **J.Anim.Sci.,** v. 70, p. 4018-4035, 1992.

PELL, J.M.; BATES, P.C. The nutritional regulation of growth hormone action. **Nutr. Res. Vet.**, v. 3, p. 163–192, 1990.

PEREIRA, J.C.C. Contribuição genética do Zebu na pecuária bovina do Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 205, p. 30-38, 2000.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Análise genética de algumas características reprodutivas e suas relações com o desempenho ponderal na raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n.6, p. 720-727, 2001.

PETERSEN, S.L.; OTTEM, E.N.; CARPENTER, C.D. Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. **Biol. Reprod**., v. 69, p. 1771-1778, 2003.

PONS, S.; TORRES-ALEMAN, I. Estradiol modulates insulin-like growth factor I receptors and binding proteins in neurons from the hypothalamus. **J Neuroendocrinol**, v. 5, p.267-271, 1993.

PONZONI, R.W. Which trait for genetic improvement of beef cattle reproduction: calving rate ar ealving day. **J. Anim. Breed. Gen**. v. 10, n 2, p. 119-128, 1992.

QUINTON, N.D.; SMITH, R.F.; CLAYTON, P.E.; GILL, M.S.; SHALET, S.; JUSTICE, S.K. Leptin binding activity changes with age: the link between leptin ad puberty. **J Clin Endocrinol Metab.,** v. 84, p. 2336–2341, 1999.

RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.O.; HONARAMOZ, A.; BARTLEWSKI, P.M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Anim. Reprod. Sci**., v. 78, p. 259-270, 2003.

RENTSCH, J.; CHIESI, M. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. **FEBS Lett**., v. 379, p. 199655–59, 1996.

RESTLE, J.; POLLI, V.A.; SENNA, D.R. Efeito do grupo genético e heterose sobre a idade e peso a puberdade e sobre o desempenho reprodutivo de novilhas de corte. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 34, n.4, p. 701-707, 1999.

RICHARDS, M.W.; WETTEMANN, R.P.; SPICER, L.J.; MORGAN, G.L. Nutritional anestrus in beef cows: effects of body condition and ovariectomy on serum LH and IGF-I. **Biol. Reprod.**, v. 44, p. 961-966, 1991.

ROBERTS, C.A.; MCCUTCHEON, S.N.; BLAIR, H.T.; Developmental patterns of plasma insulin-like growth factor-l concentrations in sheep. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v. 4, p. 457-463, 1990.

ROBINSON, J.J. Nutrition in the reproduction of farm animals. **Nutr. Res. Rev.**, v. 3, n.2, p. 253-276, 1990.
ROCHA, M.G.; LOBATO, J.F.P. Avaliação do desempenho reprodutivo de novilhas de corte primíparas aos dois anos de idade. **R. Bras. Zootec**., v. 31, n.3, p. 1388-1395, 2002.

RODRIGUES, H.D.; KINDER, J.E.; FITZPATRICK, L.A. Estradiol regulation of uteinizing hormone secretion in heifers of two breeds that reach puberty at different ages. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 603-609, 2002.

ROMANO, M.A. Efeito do nível nutricional sobre a antecipação da idade à puberdade e caracterização da dinâmica folicular nos períodos pré e pós púbere em novilhas Nelore. 1997. 103f Tese (Doutorado em Reprodução animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

SALADIN, R.; DE VOS, P.; GUERRE-MILLO, M.; LETURQUE, A.; GIRARD, J.; STAELS, B.; AUWERX, J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. Nature, v. 377, p. 527-529, 1995.

SALACINSKI, P.R.; MCLEAN, C.; SYKES, J.E.; CLEMENT-JONES, V.V.; LOWRY, P.J. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha,6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen). Anal. Biochem., v. 117, n°1, p. 136-146, 1981.

SAUERWEIN, H.; HEINTGES, U.; HENNIES, M.; SELHORST, T.; DAXENBERGER, A. Growth hormone induced alterations of leptin serum concentrations in dairy cows as measured by a novel enzyme immunoassay. **Livest. Prod. Sci.**, v. 87, p. 189–95, 2004.

SCHRICK, F.N.; SPITZER, J.C.; JENKINS, T.C.; HENRICKS D.M.; ALTHEN, T.G. Effect of dietary energy restriction in cattle and sheep. **J. Anim. Sci**., v. 68, n.3, p. 799-816, 1990.

SCHILLO, K.K.; HALL J.B.; HILEMAN, M. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. **J. Anim. Sci**., v. 70, p. 3994-4005, 1992.

SCHILLO, K.K. 'Oestrus Cycles', 2003. Encyclopedia of Dairy Sciences. San Diego, CA: Academic Press.

SCHOPPEE, P.D.; ARMSTRONG, J.D.; HARVEY, R.W.; WHITACRE, M.D.; FELIX, A.; CAMPBELL, R.M. Immunization against growth hormone releasing factor or chronic feed

restriction initiated at 3.5 months of age reduces ovarian response to pulsatile administration of gonadotropinreleasing hormone at 6 months of age and delays onset of puberty in heifers **Biol. Reprod.**, v. 55, p. 87-98, 1996.

SEMMELMANN, C.E.N.; LOBATO, J.F.P.; ROCHA, M.G. Efeito de Sistemas de Alimentação no Ganho de Peso e Desempenho Reprodutivo de Novilhas Nelore Acasaladas aos 17/18 Meses. **Rev. bras. zootec**., v. 30, n°3, p. 835-843, 2001

SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A. Relationships among weight gains, age at puberty and reproductive performance in heifers. **J. Anim. Sci.**, v. 32, p. 127–131, 1971.

SILVA, J.A.II V.; DIAS, L.T.; ALBUQUERQUE, L.G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore, R. Bras. Zootee., v. 34, n. 5, p. 1568-1572, 2005.

SINHA, M.K.; OPENTANOVA, I.; OHANNESIAN, J.P.; KOLACZYNSKI, J.W.; HEIMAN, M.L.; HALE, J. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p. 1277–1282, 1996.

SKYNNER, M.J.; SIM, J.A.; HERBISON, A.E. Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinol.**, v. 140, p. 5195-5201, 1999.

SMITH, M.J.; JENNES, L. Neural signals that regulate GnRH neurons directly during the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 122, p. 1-10, 2001.

SOLDANI, R.; CAGNACCI, A.; PAOLETTI, A.M.; YEN, S.S.C.; MELIS, G.B. Modulation of anterior pituitary luteinizing hormone response to gonadotropin-releasing hormone by insulin like growth factor I *in vitro* . **Fertil. Steril.**, v. 64, p. 634-637, 1995.

SOUZA, E. M.; MILAGRES, J. C.; SILVA, M. A.; REGAZZI, A. J.; CASTRO, A. G. C. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. **R. Soc. Bras. Zootec**. v. 24, n.6, p. 926-935, 1995.

SPICER, L.J.; CROWE, M.A.; PRENDIVILLE, D.J.; GOULDING, D.; ENRIGHT, W.J.; Systemic but not intraovarian concentrations of insulin-like growth factor-I are affected by short-term fasting. **Biol. Reprod.**, v. 46, p. 920-925, 1992.

SPICER, L.J.; ECHTEMKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v. 12, p. 223-245, l995.

SPITZER, J.C.; MORRISON, D.G.; WETIEMANNI, R.P.; FAULKNELS, L.C. Reproductive responses and calf birth and weaning weights as affected by body condition at parturition and postpartum weight gain in primiparous beef cows. **J. Anim. Sci.,** v. 73 (5) p. 1251-1257, 1995.

SRIVASTAVA, V.; HINEY, J.K.; NYBERG, C.L.; DEES, W.L. The effect of ethanol on the synthesis of insulin-like growth factor-l (IGF-I) and the IGF-I receptor in late oreoubertal female rats: A correlation with serum IGF-I. **Alcoholism Clin Exp'Rel.,** v. 19, p. 1467-1473, 1995.

TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; HASHIZUME, K. Generation and characterization of anti-leptin antisera against syntetic peptides and recombinant proteins. **J. Reprod. Develop.,** v. 50, n°6, p. 717-724, 2004 .

TARTAGLIA, L.A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G.J.; CAMPFIELD, L.A.; CLARK, F.T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K.J.; SMUTKO, J.S.; MAYS, G.G.; WOOLF, E.A.; MONORE, C.A.; TEPPER, R.I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, p. 1263–1271, 1995.

TEIXEIRA, R. A. **Comparações bio-econômicas entre dois sistemas de produção com diferentes níveis de fertilidade em rebanho Nelore a pasto. Jaboticabal.** 1997. 42 p. Monografia (Graduação em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, 1997.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D.L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocr. Rev.**, v. 22, p. 111-151, 2001.

THISSEN, J.P.; KETELSLEGERS, J.M.; UNDERWOOD, L.E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. **Endocr. Rev.**, v. 15, p. 80–101, 1994.

THOMAS, M.G.; CARROLL, J.A.; RAYMOND, S.R.; MATTERI, R.L.; KEISLER, D.H. Transcriptional regulation of pituitary synthesis and secretion of growth hormone in growing wethers and the irdluence of zeranol on these mechanisms. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v. l, p. 309-324, 2000.

UNGER, RH. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. **Endocrinol.**, v.144, p. 5159–5165, 2003.

VAITUKAITIS, J.L.; ROBBINS, J.B.; NIESEHLAG, E.; ROSS, G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. **J. Clin. Endocrinol. Metab,** v. 33, p. 988-991, 1971.

VALLE, E.R.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L.R.L. DE S. Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 80p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 71).

VIZCARRA, J.A.; WETTEMANN, R.P.; BRADEN, T.D.; TURZILLO, A.M.; NETT, T.M. Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone, GnRH receptors, and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in cows. **Endocrinol.**, v. 138, p. 594-601, 1997.

VIZCARRA, J.A.; WETTEMANN, R.P.; SPITZER, J.C.; MORRISON, D.G. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin, and nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 927–936, 1998.

WADE, G.N.; SCHNEIDER, J.E.; Metabolic fuels and reproduction in female mammals. **Neurosc. Biobehav. Rev.,** v. 16, p. 235-72, 1992.

WANG, J.; LIU, R.; HAWKINS, M.; BARZILAI, N.; ROSSETTI, L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature,** v. 393, p. 684–698, 1998.

WEHRMAN, M.E.; KIJIMA, F.N.; SANCHEZ, T.; MARISCAL, D.V.; KINDER, J.E. Incidence of precocious puberty in developing beef heifers. **J. Anim. Sci**., v. 74, p. 2462-2467, 1996.

WERTHER, A.; HOGG, A.; OLDFIELD, B.J.; MCKINLEY, M.J.; FIGDOR, R.; MENDELSOHN, F.A.O. Localization and characterization of IGF-I receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry.A distinct distribution from insulin receptors. **J. Neuroendocrinol.**, v. 1, p. 369-377, 1989.

WILLIAMS, G.L. Nutritional factors and reproduction, In: KNOBIL E.; NEILL J. (Ed.) **Encyclopedia of reproduction**. New York, NY:Academic Press, 1998.

WILLIAMS, G.L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Dom. Anim. Endocrinol.,** v. 23, p. 339-349, 2002.

WILTBANK, J.N.; ROBERTS, S.; NIX, J.; ROWDEN L. Reproductive performance and profitability of heifers fed to weigh 272 or 318 kg at the start of the first breeding season. **J. Anim. Sci**., v. 60 (1), p. 25-34, 1985.

WILTBANK, J.N.; GREGORY, K.E.; SWIGER, L.A., INGALLS, J.E.; ROTHLISBERGER, J.A.; KOCH, R.M. Effects of heterosis on age and weight at puberty in beef heifers. **J. Anim Sci.,** v. *25*1 p. 7441 1966.

WOLFE, M.W.; STUMPF, T.T.; WOLFE, P.L.; DAY, M.L.; KOCH, R.M.; KINDER, J.E. Effect of selection for growth traits on age and weight at puberty in bovine females. **J. Anim Sci.**, v. 68, p. 1595-1602, 1990.

WOLFE, M.W.; STUMPF, T.T.; ROBERSON, M.S.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Opioid and 17ß-estradiol regulation of LH and FSH secretion during sexual maturation in heifers. **Domest Anim Endocrinol**. v. 8, p. 491-498, 1991.

YALOW, R.S.; BERSON, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. **J. Clin. Invest**., v. 39, p. 1157-1175, 1960.

YALOW, R. S. Radioimunoensaio de hormônios. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D.W. (Ed.). **Williams**: tratado de endocrinologia. 7. ed. São Paulo: Manole, 1988. v. 1. p. 154-165.

YELICH, J.V.; WETTERMANN, R.P.; MARSTON, T.T.; SPICER, L.J. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. **Dom. anim. endocrinol.**, v. 13, n.4, p. 325-338, 1996.

YONEKURA, S.; SENOO, T.; KOBAYASHI, Y.; YONEZAWA, T.; KATOH, K.; OBARA, Y. Effects of acetate and butyrate on the expression of leptin and short-form leptin receptor in bovine and rat anterior pituitary cells. **Gen. Comp. Endocrinol.,** v. 133, p. 165–172, 2003.

YUEN, B.S.; OWENS, P.C.; MCFARLANE, J.R.; SYMONDS, M.E.; EDWARDS, L.J.; KAUTER, K.G.; MCMILLEN, I.C. Circulating leptin concentrations are positively related to leptin messenger RNA expression in the adipose tissue of fetal sheep in the pregnant ewe fed at or below maintenance energy requirements during late gestation. **Biol. Reprod.,** v. 67, p. 911–916, 2002.

ZAMORANO, P.L.; MAHESH, V.B.; DESEVILLA, L.M.; CHORICH, L.P.; BHAT, G.K.; BRANN, D. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. **Neuroendocrinol.,** v. 65, p. 223–228, 1997.

ZHANG, Y.; PROENÇA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425–432, 1994.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; MORTON, S.; GALLINO, J.L.; EDWARDS, J.F.; HARMS, P.G.; WILLIAMS, G.L. Effects of leptin on basal and GHRH-stimulated GH secretion from the bovine adenohypophysis are dependent upon nutritional status. **J. Endocrinol.,** *v.* 178, p. 83–89, 2003.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; MORTON, S.; MACIEL, M.N.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin at the hypothalamic–hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. **Biol. Reprod.,** v. 71, p. 804– 812, 2004.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo