

JULIANE DINIZ MAGALHÃES

**Efeito da leptina e da nutrição sobre o perfil de expressão de genes hipotalâmicos
em novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*) no início da puberdade**

Pirassununga

2010

JULIANE DINIZ MAGALHÃES

Efeito da leptina e da nutrição sobre o perfil de expressão de genes hipotalâmicos em novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*) no início da puberdade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva

Pirassununga

2010

ERRATA

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Folha de Avaliação	2	puberdade: estudo experimental.	puberdade.
Resumo	1	puberdade: estudo experimental.	puberdade.
Abstract	1	puberty : an experimental study.	puberty .

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.2284
FMVZ

Diniz-Magalhães, Juliane

Efeito da leptina e da nutrição sobre o perfil de expressão de genes hipotalâmicos em novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*) no início da puberdade / Juliane Diniz-Magalhães. -- 2010.

107 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

1. Reprodução. 2. Hipotálamo. 3. Neuropeptídeo Y. 3. PCR quantitativo.
4. Microarray. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da leptina e da nutrição sobre o perfil de expressão de genes hipotalâmicos em novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*)", protocolado sob o nº 1331/2008, utilizando 24 (vinte e quatro) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 23 de abril de 2008.

We certify that the Research "Leptin and nutrition effect on gene expression profile of hypothalamic genes in *Bos taurus indicus* heifers", protocol number 1331/2008, utilizing 24 (twenty four) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/23/08.

São Paulo, 23 de abril de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DINIZ-MAGALHÃES, Juliane

Título: Efeito da leptina e da nutrição sobre o perfil de expressão de genes hipotalâmicos em novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*) no início da puberdade: estudo experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

*Dedico à todas as pessoas
que correm atrás dos seus
sonhos, buscam por seus
objetivos e não se esquecem
daqueles que o ajudaram a
crescer, a vocês dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a oportunidade, a força e todas as bênçãos recebidas. E à Nossa Senhora por me proteger em todos os momentos.

À minha família, meu maior tesouro, meu chão, meu mundo. À minha mãe, Leila, meu porto seguro e meu maior apoio, a quem tanto amo. Ao meu pai que me apresentou outro mundo e uma família que aprendi a amar logo de início. Aos meus avós, Maria e Afonso, fontes de inspiração, alicerces da nossa família, exemplos de união e amores da minha vida. À minha avó Estelita, muitas saudades e ao avô Ernesto que não tive oportunidade de conhecer. Aos meus tios e padrinhos, Keila (amiga inseparável e verdadeira), Marciano (incentivador das minhas idéias mais malucas), Afonso Júnior (pai dos meus amores), Marlon, Sônia, Netinho, Smênia, Valmira, Alexandre, Néia, Vanusa, Alípio, Toninho, Mara, eternos cúmplices, amigos, apoios, pessoas que ajudaram a formar minha personalidade e me ajudaram a ser uma pessoa melhor, obrigada por confiarem em mim. Aos meus irmãos Newton, Daniel, Grégory, parceiros eternos de vida, farras, bons momentos e dificuldades e às minhas irmãs Isabela e Livia, minhas lindas pequenas, como é bom ter irmãs! Amo a todos vocês! Aos meus primos lindos, quase irmãos, Neto, Gu, Bia (minha bonequinha) e Arthur, penso muito em vocês, só vocês sabem o quanto são importantes para mim. Aos primos lindos e não menos importantes, Fred, Breno, Grazian, Dani (e família), amo vocês demais apesar da distância. Aos meus dois afilhados Arthurzinho e Gu, que me desmontam a cada passagem em Brasília. Arthur e Bia hajam lágrimas para tantas despedidas, amo vocês demais meus pequenos, tenham a certeza de que muito do meu esforço é pensando em vocês.

A todos os meus amigos de Brasília, que entendem o motivo da minha distância, mas não menor consideração.

À FAPESP pelo auxílio financeiro à pesquisa.

À CAPES pela bolsa de mestrado, que me possibilitou ter tranquilidade no desenvolvimento de minhas atividades.

À Coordenadoria do Campus de Pirassununga por disponibilizar as instalações do matadouro escola e confinamento.

Ao professor Luis Felipe Prada e Silva, por todo o apoio e principalmente pela confiança depositada em mim. Posso dizer sem reservas que tenho um ORIENTADOR de verdade, participativo e preocupado com o desenvolvimento adequado do trabalho e mais

ainda com a formação de profissionais e pessoas melhores. Professor, tenho muito orgulho em dizer que trabalho e convivo com você. Obrigada pelo apoio e amizade.

Aos meus professores e eternos amigos da UPIS que sempre me apoiaram e colocaram para frente, em especial a todos que me colocaram no caminho da Nutrição, Reprodução e Biologia Molecular.

Aos professores do departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP por todos os ensinamentos e pelo convívio.

Aos professores Flávio Meirelles, Felipe Perecin e Heidge Fukumasu, por abrirem as portas do LMMD sempre que precisei.

À professora Sandra Cecatto Antonini e suas orientadas pela disponibilidade na utilização do LAMAM na UFSCAR, muito obrigada.

Ao professor Sérgio Verjovisk e ao seu orientado Yuri Moreira do Instituto de Química, pela disponibilidade e pelo auxílio na utilização do *scanner*.

Ao professor Ed Hoffman, ao Zé Rodrigo e à Lindsay, pelo auxílio durante o experimento a campo e pela amizade, sem vocês teria sido muito mais difícil.

Aos amigos inesquecíveis da pós-graduação que já passaram por aqui Daniella, Juliana Pinheiro, Eriketa (e família), Rodrigo (tenente), Michelle, Vinícius, Pascoal, Rafael (Calabria), Samuel, Diego, Walter, Milton, Octávio, Felipe Horta, Yara, Rosana, Fernando (Boi), Marco Aurélio, Carol Malek, Eugênio, Leonardo, inúmeros bons momentos. E aos que ainda permanecem Paula, Julianne Naves, Henry, Iaçanã, Juliana Barreiro, Lari, Esther, Daniela (Maria), Henrique, Elmeson, Bruno Botaro, Cristina, Marina, José Esler, Jefferson, Rafael Barleta (Bisão), Paulo Gil, Nara, João Paulo (Johnny), João Guilherme, Maria Fernanda, Fernandinha, Francini, Rafael, Mayara, Bia (Bixuca), Ana Paula. Espero não ter esquecido ninguém.

À Carol Tobias, pessoa que admiro muito, obrigada pela sua amizade e por nos salvar em nossos momentos críticos. Adoro você.

Gostaria de dizer aos meus queridos irmãozinhos de casa que me suportam e suportaram todas as minhas boas fases e meus estresses que amo vocês e vocês fazem parte de muito do que sou hoje. Ju Naves, minha querida amiga de tanto tempo, você sabe o quanto gosto de você e prezo sua amizade e carinho, mais do que nunca sei que é meu apoio, amo muito você. Johnny, eterno chatinho, sabe que amo você demais, sinto falta até de suas manhas, obrigada por ter sido tão companheiro. Renan, carioquinha impagável, agradeço o carinho e cuidado, adoro você. Elmeson, mineirinho querido, você sabe o quanto gosto de você e o quanto o considero, quem diria que você entraria em nossas vidas meio sem querer e

não sairia mais. Babita, companheiríssima de muitos anos, já vivemos muitas fases e a que virá será muito melhor, te amo demais ANJINHA. E aos demais ex-moradores, Camila (Xixi), Bruno (Assado), Marcos, Rodrigo (Donzela). Obrigada por tudo!!!

Aos inúmeros agregados de todas as fases daquela república, com cara de casa de família, é um privilégio conviver com vocês.

Aos cães e animais agregados, por tornarem meus dias menos pesados.

Às novilhas, motivos do meu estudo.

Às pessoas mais especiais que conheci e convivi aqui, Pauleta, Dani Donato, Ju Pin, Ju Mega, Eriketa, vocês serão sempre as meninas do VNP assim como eu, e ao Henry, ao Johnny, ao mineirinho, ao Boi e ao Lucas. Guardo vocês em um lugar mais que especial. Obrigada pela oportunidade de conviver com vocês e desfrutar desta amizade forte e verdadeira.

Aos colegas de trabalho e companheiros de tantas horas: Luis Felipe, Marina, Samuel, Diego, Daniela (Dani Maria), Bruno, Ana Paula (Bodinha), Natália (Caiçara), Larissa (Delícia), Anna Beatriz (Bia), Gabriela (Gabi), Rafael Santos (Biju), Marco (Brocha), Tomás, Rafael Sanches e Bárbara (Babita). Aprendo e cresço com vocês todos os dias, vocês fazem parte desta conquista, obrigada.

Às meninas do A2, Camis e Claudinha, obrigada pela parceria e apoio.

À família que ganhei aqui: Ceci, Sr. Jairo, Lucas, Henrique e Marília, por me fazerem me sentir mais em casa e por todos os fins de semana no rancho.

Aos funcionários do VNP, em especial à Alessandra (Lelê), ao Zeca e ao João que seguram nossos rojões, muito obrigada. Aos funcionários da Bromato, da TPOA, da faxina e da segurança, muito obrigada.

Aos funcionários do STAPIR, Marcão, Paula, Alex e Limarque por todo o auxílio e dedicação. À Telma e a Míriam, que sempre cuidaram do nosso ambiente de trabalho, obrigada.

Ao Alê e ao Júnior por todo auxílio técnico em informática e mais ainda pela amizade e carinho.

Aos funcionários do Gado de Corte, Ismael, Paulinho, Ricardo e Roberlei que tanto me ajudaram no manejo das novilhas nos inúmeros abates.

A todos os funcionários do matadouro escola, pela disponibilidade e apoio, sem vocês não teria conseguido, obrigada.

Aos funcionários da equideocultura, Valdir e Maico e da bubalinocultura, Cuel e Pavão, pelos inúmeros cafês e pelo carinho.

Aos funcionários dos fistulados Sr. Gilmar, Éverson, João, Sr. Manuel, Ricardo, Zanquetin, e da fábrica de ração, por todo apoio.

Aos queridos amigos do vôlei, que me ajudaram a controlar o estresse do dia-a-dia e me proporcionaram momentos inesquecíveis, em especial aos integrantes do meu trio, Vinícius (Treco) e Marco, vice-campeões do 1º Torneio de Trios.

Ao Margutti e a Rafa, é muito bom saber o quanto vocês gostam da Diniz. Obrigada por me incentivarem e torcerem por mim dentro e fora de quadra. À vocês minha eterna admiração e carinho. Só para não perder o costume... “Eu cresço é na pressão!!!”.

A todos que fizeram parte desta caminhada, agradeço de coração.

RESUMO

DINIZ-MAGALHÃES, J. **Efeito da leptina e da nutrição sobre o perfil de expressão de genes hipotalâmicos em novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*) no início da puberdade:** estudo experimental. [Leptin and nutrition effect on gene expression profile of hypothalamic genes in *Bos taurus indicus* heifers: an experimental study]. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

Investigou-se o efeito da leptina exógena e do maior consumo de energia, sobre o padrão da expressão de genes no hipotálamo de novilhas zebuínas; de modo a elucidar o mecanismo de sinalização da leptina no hipotálamo e os genes responsáveis pela obtenção da puberdade. Trinta e seis novilhas não púberes, e com idade entre 18 e 20 meses, foram divididas em três grupos experimentais: baixa energia (BAIXA), alta energia (ALTA), baixa energia com administração de leptina recombinante ovina (BAIXA+LEP), totalizando 56 dias de tratamento. Vinte e quatro novilhas foram abatidas ao apresentar sinais de puberdade, sendo eles: concentração de progesterona no soro superior a 1 ng/mL por duas amostras seguidas e presença de corpo lúteo detectável por ultra-sonografia. O hipotálamo foi colhido e armazenado a -80°C. As amostras foram submetidas à extração do RNA total, tratadas com DNase I e submetidas à síntese de cDNA. A quantificação relativa de quatro genes candidatos reconhecidamente envolvidos com a sinalização hipotalâmica da leptina em bovinos: NPY, NPY-Y1, NPY-Y4 e SOCS-3, foi feita através de PCR quantitativo (tempo real). Não houve efeito da administração de leptina sobre a expressão do NPY ($P=0,70$), ou de seus receptores: NPY-Y1 ($P=0,27$) e NPY-Y4 ($P=0,92$) no início da puberdade. A expressão de SOCS-3 foi reduzida ($P=0,05$) no hipotálamo de novilhas tratadas com leptina, o que sugere menor ação inibitória sobre a leptina. Em novilhas alimentadas com dieta de alta energia, a expressão do NPY-Y1 foi reduzida ($P=0,04$), o que indica que o hipotálamo estaria menos sensível à ação do NPY, permitindo a entrada precoce em puberdade. Nos demais genes estudados, NPY ($P=0,75$), NPY-Y4 ($P=0,92$) e SOCS-3 ($P=0,24$), a dieta não alterou significativamente suas expressões hipotalâmicas. Estudo mais abrangente do efeito da nutrição e da administração de leptina foi realizado através de hibridização em microarranjos de DNA, objetivando a identificação de possíveis genes candidatos, expressos no hipotálamo, que influenciam na obtenção da puberdade em novilhas Nelore tratadas com leptina ou submetidas à dieta de alta energia. Foram encontrados 78 genes cuja expressão foi alterada pela densidade energética da dieta ($P<0,05$) no hipotálamo das novilhas Nelore, destes foram selecionados os que apresentaram razões de expressão da ordem de 1,4 ou mais, totalizando

20 genes. Entre esses se destaca o gene da β -arrestina 1 (ARRB1), que foi 1,40 vezes mais expresso ($P=0,04$) em novilhas submetidas à dieta de alta energia, pois atua na mediação da dessensibilização dos receptores acoplados à proteína-G-(GPCRs)1, como os receptores de NPY. Foram encontrados 134 genes diferencialmente expressos ($P<0,05$) devido a aplicação de leptina. Dentre os 80 genes que apresentaram razões superiores a 1,4, 18 genes tiveram a expressão reduzida, e 62 tiveram a expressão aumentada pela aplicação de leptina. Destes, alguns estão envolvidos na regulação da sinalização da leptina. O gene SRC foi menos expresso (1,64 vezes; $P=0,04$) em novilhas tratadas com leptina, o que sugere menor ação inibitória pela SHP-2. A proteína SOCS-2 foi 1,43 vezes ($P=0,01$) mais expressa no hipotálamo de novilhas tratadas com leptina. Sabe-se que, ao contrário de SOCS-1 e SOCS-3, CIS e SOCS-2 não se ligam, ou inibem, as *janus kinases*. O STAT-3 foi 2,14 vezes ($P=0,03$) mais expresso em novilhas tratadas com leptina, e sua ativação possibilita a ligação hipotalâmica da leptina com seu receptor (*Ob-Rb*). As IGFPB-1 e -2 foram mais expressas no hipotálamo de novilhas tratadas com leptina que em novilhas não tratadas, sendo IGFPB-1 1,78 vezes ($P=0,04$) mais expressa e IGFPB-2 1,89 vezes ($P=0,05$). As IGFPBs podem desempenhar função de potencialização da ação do IGF-1, ou exercer ação inibitória. Conclui-se que tanto o consumo de energia quanto a aplicação com leptina influenciaram o padrão de expressão gênica no hipotálamo de novilhas Nelore. A modulação da quantidade do receptor do NPY, NPY-Y1, no hipotálamo pode ser uma via importante pela qual a nutrição afeta o início da puberdade em novilhas. E ainda que estudos mais aprofundados de expressão dos genes encontrados nas hibridizações por microarranjo poderão revelar interações mais concisas entre os genes, a nutrição e a leptina na obtenção da puberdade.

Palavras chave: Reprodução. Hipotálamo. Neuropeptídeo Y. PCR quantitativo. *Microarray*.

ABSTRACT

DINIZ-MAGALHÃES, J. **Leptin and nutrition effect on gene expression profile of hypothalamic genes in *Bos taurus indicus* heifers on the onset of puberty**: an experimental study. [Efeito da leptina e da nutrição sobre o perfil de expressão de genes hipotalâmicos em novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*): estudo experimental]. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

It was investigated the effect of exogenous leptin and the high energy intake on gene expression pattern in the hypothalamus of zebuine heifers; in a way to elucidate the mechanism of leptin signaling in hypothalamus and the responsible genes for puberty. Thirty six heifers not in puberty at 18 and 20 months of age were divided in three experimental groups: low energy diet (LOW), high energy diet (HIGH), low energy diet with administration of recombinant ovine leptin (LOW+LEP), totalizing 56 days of treatment. Twenty four heifers were slaughtered when presented the signals of puberty: progesterone serum concentration above 1 ng/mL for two followed weeks and the presence of detectable corpus luteum by ultrasonography. The hypothalamus was collected and stored at -80°C. Samples were submitted to total RNA extraction, treated with DNase I and submitted to cDNA synthesis. The relative quantification of four candidate genes admittedly involved with hypothalamic leptin signaling in bovine: NPY, NPY-Y1, NPY-Y4 and SOCS-3, was evaluated through quantitative PCR (real time). There was no effect of leptin administration on NPY expression ($P=0.70$), or on its receptors: NPY-Y1 ($P=0.27$) and NPY-Y4 ($P=0.92$) in the onset of puberty. The expression of SOCS-3 was reduced ($P=0.05$) in the hypothalamus of heifers treated with leptin, what suggests lower inhibitory action over leptin. In heifers fed high energy diets, the expression of NPY-Y1 was reduced ($P=0.04$), which indicates that the hypothalamus would be less sensitive to the action of NPY, allowing the precocious onset of puberty. In other studied genes, NPY ($P=0.75$), NPY-Y4 ($P=0.92$) and SOCS-3 ($P=0.24$), the diet did not significantly altered their hypothalamic expressions. A more comprehensive study regarding the effect of nutrition and leptin administration was performed through the hybridization in DNA microarrangements, aiming the identification of possible candidate genes, expressed in hypothalamus that influence in the onset of puberty in Nelore heifers treated with leptin or submitted to high energy diets. It was found 78 genes whose expression was altered by the energy density of the diet ($P<0.05$) in the hypothalamus of Nelore heifers. From them, it was selected those genes which presented rates of expression in the order of 1.4 or more, totalizing 20 genes. From them, the highlight gene was β -arrestin 1 (ARRB1) which

was 1.40 more expressed ($P=0.04$) in heifers fed high energy diet due to its action in the mediation of receptors desensibilization coupled to protein-G-(GPCRs)¹, as the receptors of NPY. It was found 134 genes differently expressed ($P<0.05$) due to leptin administration. From the 80 genes that presented rates of expression higher than 1.4, 18 genes had their expression reduced and 62 had their expression increased by leptin administration. Some of these 62 genes are involved in the regulation of leptin signaling. The gene SRC was the less expressed (1.64 times; $P=0.04$) in heifers treated with leptin what suggests lower inhibitory action by SHP-2. The protein SOCS-2 was 1.43 times ($P=0.01$) more expressed in the hypothalamus of heifers treated with leptin. It is known that on the contrary of SOCS-1 and SOCS-3, CIS and SOCS-2 do not bind or inhibit, as janus kinases. The STAT-3 was 2.14 times ($P=0.03$) more expressed in heifers treated with leptin and its activation enables the hypothalamic binding of leptin and its receptor (Ob-Rb). The IGFBP-1 and -2 were more expressed in the hypothalamus of heifers treated with leptin than the animals not treated, being the IGFBP-1 1.78 times ($P=0.04$) more expressed and the IGFBP-2 1.89 times ($P=0.05$). The IGFBPs could play a function of IGF-1 action enhancer or exert an inhibitory action. It is concluded that both energy intake and leptin administration influenced gene expression pattern in the hypothalamus of Nelore heifers. The modulation of the receptor quantity of NPY, NPY-Y1 in hypothalamus could be an important route in which nutrition affects the onset of puberty in heifers. Moreover, more detailed studies regarding gene expression in hybridization by microarrangement could reveal more concise interactions between genes, nutrition and leptin in the onset of puberty.

Key words: Reproduction. Hypothalamus. Neuropeptide Y. Quantitative PCR. Microarray.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mecanismo molecular de regulação negativa da sinalização das citocinas pelas proteínas SOCS.....	33
Figura 2 -	Ultrassonografia: A) Avaliação das novilhas por USG; B) Imagem do corpo lúteo (CL) no ultrason.....	37
Figura 3 -	Vista ventral do encéfalo. Estruturas utilizadas na localização e como referência para a colheita do Hipotálamo.....	38
Figura 4 -	Metodologia de amostragem dos tecidos: A) Amostra de fígado picada em pequenos pedaços e tubo Falcon (15 mL) identificado; B) Amostra congelada em N-líquido em copo de isopor; C) Pós-congelamento amostra armazenada no tubo Falcon.....	38
Figura 5 -	Delineamento experimental para análise da expressão gênica por microarranjos de oligonucleotídeos. Alexa Fluor 555 = ● e Alexa Fluor 647 = ● . Cada combinação foi repetida 6 vezes num total de 12 hibridizações.....	47
Figura 6 -	A) Imagem do <i>scanner</i> ligado ao computador; B) <i>Scanner</i> aberto, com o suporte fechado; C) Suporte aberto – local onde é encaixado o <i>slide</i> com a impressão virada para baixo; D) Imagem ampliada da região escaneada; E) Blocos e spots alinhados; F) Procedimento de ajuste do ganho PMT.....	57
Figura 7 -	Colheita e dissecação dos ovários. Exemplos de corpos lúteos (CL) que comprovaram a ovulação.....	60
Figura 8 -	Avaliação da integridade do RNA extraído utilizando o gel de agarose 1 %, separados por tratamento.....	63
Figura 9 -	Géis de agarose 2 % dos genes alvo e do gene controle, comprovando a amplificação dos insertos e seus respectivos número de pares de base.....	64
Figura 10 -	Curvas de amplificação, gráfico representativo das médias dos ciclos de amplificação, com padrão linear negativo. Dados de eficiência, <i>slope</i> e coeficientes de regressão (R^2).....	66
Figura 11 -	Gene NPY – Curvas de Amplificação (CA) em escala logarítmica e Curvas de Dissociação (CD), separados por grupos de novilhas (N), utilizados na amplificação em PCR em tempo real.....	67
Figura 12 -	Gene NPY-Y1 – Curvas de Amplificação (CA) em escala logarítmica e Curvas de Dissociação (CD), separados por grupos de novilhas (N), utilizados na amplificação em PCR em tempo real.....	67

Figura 13 - Gene NPY-Y4 – Curvas de Amplificação (CA) em escala logarítmica e Curvas de Dissociação (CD), separados por grupos de novilhas (N), utilizados na amplificação em PCR em tempo real.....	68
Figura 14 - Gene SOCS-3 – Curvas de Amplificação (CA) em escala logarítmica e Curvas de Dissociação (CD), separados por grupos de novilhas (N), utilizados na amplificação em PCR em tempo real.....	68
Figura 15 - Razão média da expressão dos genes NPY, NPY-Y1, NPY-Y4 e SOCS-3 em novilhas Nelore pós-púberes. Linhas de barras representam o erro padrão da média. Valores de p significativos estão apresentados em negrito.....	70
Figura 16 - Gel de agarose-formaldeído dos <i>pools microarray</i> . HA – hipotálamo ALTA; HBL – hipotálamo BAIXA+LEP; HB – hipotálamo BAIXA.....	72
Figura 17 - Contraste Energia - Gráficos <i>M vs A</i> dos desvios dos dados devido ao corante de cada slide e gráficos <i>M vs A</i> após normalização dos dados por LOESS.....	73
Figura 18 - Contraste Leptina - Gráficos <i>M vs A</i> dos desvios dos dados devido ao corante de cada slide e gráficos <i>M vs A</i> após normalização dos dados por LOESS.....	74
Figura 19 - Slide escaneado, com os 4 quadrantes divididos.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos experimentais, número de animais por tratamento, tratamento, ganho médio diário (GMD) e dietas.....	36
Tabela 2 -	Critérios utilizados para delineamento dos <i>primers</i>	43
Tabela 3 -	<i>Primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) e suas respectivas temperaturas de fusão (T _m), porcentagem de GC (GC%) e números de pares de bases (pbs) dos genes: NPY, NPY-Y1, NPY-Y4, SOCS-3, RP-L19.....	44
Tabela 4 -	Descrição dos grupos de novilhas formados para a análise da expressão gênica em real time.....	46
Tabela 5 -	Descrição das amostras e corantes utilizados em cada hibridização.....	48
Tabela 6 -	Identificação dos <i>pools</i> das amostras de RNA do hipotálamo, preparados para a síntese do cDNA, separados por tratamento e descrição das concentrações e volumes ajustados para confecção dos <i>pools</i>	49
Tabela 7 -	Descrição dos reagentes e suas respectivas concentrações, utilizados no preparo das soluções para a lavagem dos slides.....	55
Tabela 8 -	Relação dos pesos de abate das novilhas, classificados por tratamento e respectivas datas de abate.....	61
Tabela 9 -	Leituras em espectrofotômetro dos comprimentos de onda 260 e 280 nm, razão entre eles e concentrações (µg/mL) das amostras de hipotálamo das novilhas, separadas por tratamento.....	62
Tabela 10 -	Gene, número de acesso no GeneBank, número de pares de base (pb) e sequência do <i>amplicon</i>	64
Tabela 11 -	Análise do efeito da dieta e da leptina sobre a expressão gênica do Neuropeptídeo Y (NPY) e de seus receptores NPY-Y1 e NPY-Y4 e do supressor da sinalização da citocina (SOCS-3) no hipotálamo de novilhas Nelore.....	69
Tabela 12 -	Relação dos genes diferencialmente expressos no contraste energia, classificados pela função biológica, com os respectivos símbolos, função biológica depositada no Gene Ontology (GOBiol), razão, erro padrão da média (EPM) e probabilidade.....	76
Tabela 13 -	Relação dos genes cujas expressões foram reduzidas com a aplicação de leptina, classificados pela função biológica, com os respectivos símbolos, função biológica depositada no Gene Ontology (GOBiol), razão, erro padrão da média (EPM) e probabilidade.....	78

Tabela 14 - Relação dos genes cujas expressões foram elevadas com a aplicação de leptina, classificados pela função biológica, com os respectivos símbolos, função biológica depositada no Gene Ontology (GOBiol), razão, erro padrão da média (EPM) e probabilidade.....	79
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	23
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO HIPOTALÂMICA DO INÍCIO DA PUBERDADE.....	24
3.1.1 Leptina e puberdade.....	25
3.1.2 Sinalização da leptina no hipotálamo	26
3.2 EFEITO DA NUTRIÇÃO NA OBTENÇÃO DA PUBERDADE.....	26
3.2.1 Leptina e nutrição.....	27
3.3 RECEPTOR DA LEPTINA (OB-RB) E OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À LEPTINA	28
3.4 NPY.....	29
3.4.1 Receptores do NPY.....	31
3.5 SOCS-3.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 LOCAIS E LABORATÓRIOS	35
4.2 ANIMAIS E TRATAMENTOS.....	35
4.3 TRATAMENTO HORMONAL, PESAGENS, COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO E ANÁLISE DA PROGESTERONA (P4)	36
4.4 ABATE DOS ANIMAIS.....	37
4.4.1 Critérios de seleção.....	37
4.4.2 Metodologia de abate e colheita dos tecidos.....	37
4.5 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DO HIPOTÁLAMO.....	39
4.6 LEITURA EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	40
4.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	40
4.7.1 Higienização da Cuba de Eletroforese.....	40
4.7.2 Preparo do Tampão Tris-borato EDTA (TBE) 5X	40
4.7.3 Preparo do Gel de Agarose 1%	41
4.7.4 Aplicação das amostras no Gel.....	41
4.8 REMOÇÃO DO DNA COM DNASE I.....	41

4.9 SÍNTESE DO CDNA	42
4.10 DELINEAMENTO DOS PRIMERS	42
4.11 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	44
4.12 RT-PCR EM TEMPO REAL	45
4.13 MICROARRANJOS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS EM SLIDES DE VIDRO (MICROARRAYS)	47
4.13.1 Delineamento experimental	47
4.13.2 Preparo das amostras.....	48
4.13.3 Gel de agarose-formaldeído (FA) 1,2 %	49
4.13.4 Síntese do cDNA	50
4.13.5 Acoplamento ao corante fluorescente.....	51
4.13.6 Preparo das soluções estoque	53
4.13.6.1 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 20 %.....	53
4.13.6.2 Solução Padrão de Citrato Salino (SSC) 20 X	53
4.13.7 Pré-hibridização.....	53
4.13.8 Higienização do cassete de hibridização e da Lifter Slip	54
4.13.9 Pré-aquecimento do Tampão de Hibridização	54
4.13.10 Hibridização	54
4.13.11 Preparo das soluções de lavagem	55
4.13.12 Escaneamento do Slide.....	56
4.13.13 Análise estatística.....	57
4.13.13.1 PCR em Tempo Real	57
4.13.13.2 Microarranjos de DNA	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1 SELEÇÃO PARA O ABATE	60
5.2 PESOS DE ABATE	60
5.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA EXTRAÍDO	61
5.4 COMPROVAÇÃO DA QUALIDADE DO PRIMER POR PCR.....	63
5.5 PCR EM TEMPO REAL.....	65
5.5.1 Avaliação da qualidade de amplificação por PCR em tempo real.....	65
5.5.2 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	68
5.6 MICROARRANJOS DE DNA	71
5.6.1 Análise da qualidade e uniformidade do RNA utilizado	71

5.6.2 Correção dos possíveis desvios devido aos corantes dos dados de microarranjos ..	72
5.6.3 Quantificação da expressão gênica por microarray	75
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial para a produção de carne bovina. A atividade pecuária exerce uma grande função sobre o PIB nacional. A reprodução possui um papel primordial no sistema de produção de bovinos.

O início da atividade reprodutiva em fêmeas de corte tem grande influência na rentabilidade da criação de bezerros de reposição, e é um dos principais responsáveis pela baixa taxa de desfrute do rebanho brasileiro. A raça Nelore (*Bos taurus indicus*), apesar de bem adaptada às condições tropicais, atinge a puberdade em idade bem mais avançada que raças européias, mesmo quando estas são criadas em condições semelhantes (RODRIGUES et al., 2002). A idade média ao primeiro parto em rebanhos do estado de São Paulo encontra-se ao redor de 34 meses de idade, correspondendo a uma idade à concepção de 25 meses (PEREIRA et al., 2002). Mesmo quando as novilhas são expostas aos touros desde os 14 meses de idade, a concepção ocorre somente ao redor de 25 meses de idade (PEREIRA et al., 2002). Um sistema produtivo baseado na primeira parição aos quatro anos significa taxas de desfrute abaixo dos 15% e várias categorias de fêmeas vazias em recria. A primeira parição aos 36 meses implica duplicar a taxa de desfrute. Pensar na primeira parição aos 27 meses significa estar perto dos 40% de taxa de desfrute (FRIES et al., 1996).

A idade ao primeiro parto depende da idade à puberdade, sendo esta influenciada por diversos fatores externos, como nutrição e estação do ano. Porém, o peso médio à puberdade da raça Nelore também é superior ao de raças européias, demonstrando ser fisiológica, e não ambiental, a razão para a diferença na idade à puberdade (THALLMAN et al., 1999; RODRIGUES et al., 2002). Tanto em novilhas *Bos indicus* (RODRIGUES et al., 2002) como em novilhas *Bos taurus* (EVANS et al., 1994), o início da puberdade é regulado pela maturação do hipotálamo (teoria gonadostática). Entre os sinais hormonais, um aumento prepuberal nas concentrações circulantes de GH e IGF-1 acredita-se que tenham um papel no início da puberdade (YELICH et al., 1995, 1996), porém Diaz-Torga et al. (2001) não observaram relação entre a concentração de GH e a primeira ovulação em novilhas. Anteriormente à puberdade, os pulsos de hormônio luteinizante (LH) são pouco frequentes, devido à inibição do estrogênio à secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo. Com a aproximação da puberdade, a maturação do hipotálamo resulta em um decréscimo da inibição do estrogênio na secreção de GnRH, o que leva a maior frequência nos pulsos de LH e eventual ovulação (KINDER et al., 1995). A regulação fisiológica da

maturação do hipotálamo não é bem compreendida (KINDER et al., 1995). Claramente, tanto o peso vivo quanto a condição corporal influenciam a idade à puberdade (MORAN et al., 1989).

A nutrição é um elemento importante que determina o potencial reprodutivo em bovinos e outros mamíferos, sendo que o ganho de peso e a massa de tecido adiposo exercem um importante papel na obtenção da puberdade (KENNEDY; MITRA, 1963; FRISCH et al., 1973). Foi relatado por diversos autores que dietas de restrição crônica retardam o crescimento e atrasam a entrada em puberdade em roedores (CHEUNG et al., 1997), ovinos (FOSTER; OLSTER, 1985) e bovinos (DAY et al., 1986). Uma relação complexa e controversa ligando o índice de massa corporal, ou adiposidade, ao controle do eixo reprodutivo central foi proposta a mais de vinte anos (FRISCH et al., 1980) como reguladora da obtenção da puberdade e da manutenção da atividade reprodutiva normal em várias espécies (BRONSON, 1987).

Um possível sinalizador do *status* metabólico para o início da puberdade pode ser a leptina, produzida pelos adipócitos, que sinaliza a disponibilidade de energia no meio interno desde a vida fetal (MCMILLEN et al., 2006). A leptina é sensível à manipulação da dieta e aparece prestando um importante papel na transmissão dos *status* da energia de reserva ao sistema nervoso central (SNC) para regular o consumo e a função reprodutiva em ruminantes (ZIEBA et al., 2005).

Vaiciunas et al., (2008) demonstraram que em novilhas criadas a pasto, com idade média de 26 meses e peso vivo de 315 kg, que entraram em puberdade mais cedo (ciclando) tinham maior expressão da leptina pelos tecidos adiposos subcutâneo e omental do que novilhas que não entraram em puberdade (não-ciclando). Este resultado corrobora com a hipótese que a sinalização pela leptina é importante para a obtenção da puberdade, e sugere que animais com maior expressão da leptina pelo tecido adiposo podem atingir a puberdade mais cedo, com menor peso vivo.

A elucidação do mecanismo regulando a precocidade sexual de fêmeas Nelore é imprescindível para o desenvolvimento de um protocolo terapêutico de indução da puberdade ou em programas de seleção genética mais eficazes visando aumentar a eficiência da produção de novilhos de corte.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

Nossa hipótese era de que o aumento da concentração sanguínea de leptina, seja pelo maior consumo de energia, seja pela infusão subcutânea, poderia acelerar a puberdade alterando a expressão de genes hipotalâmicos, como o SOCS-3, o NPY ou seus receptores, NPY-Y1 e NPY-Y4.

Assim, objetivou-se investigar o efeito de leptina exógena e do maior consumo de energia, sobre o padrão da expressão gênica no hipotálamo de novilhas Nelore no momento da 1ª ovulação; de modo a auxiliar na elucidação do mecanismo de sinalização da leptina no hipotálamo e dos genes responsáveis pela obtenção da puberdade em novilhas zebuínas

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO HIPOTALÂMICA DO INÍCIO DA PUBERDADE

A puberdade é definida como a idade em que o animal encontra-se apto para entrar em reprodução. Diversos mecanismos fisiológicos estão envolvidos com este processo. Tanto em novilhas *Bos taurus indicus* (RODRIGUES et al., 2002), como em novilhas *Bos taurus taurus* (EVANS et al., 1994), como em ovelhas (FOSTER; RYAN, 1979), o início da puberdade é regulado pela maturação do hipotálamo, a teoria gonadostática, na qual ocorre uma dessensibilização do hipotálamo aos esteróides gonadais, resultando em aumento da secreção de gonadotrofinas (SCHAMS, 1981; EVANS et al., 1992; KINDER et al., 1995; HONARAMOOZ et al., 1999; MELVIN, 1999).

Um dos conceitos fundamentais do início da puberdade envolve um aumento na síntese e liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo, que orienta a secreção de gonadotrofina e o crescimento do folículo (CUNNINGHAM, 2004). Antes da puberdade, a secreção de GnRH e das gonadotrofinas são mantidas em xeque porque o hipotálamo é altamente sensível a ação do *feedback* negativo pelos estrógenos (CUNNINGHAM, 2004). Com a proximidade da puberdade ocorre redução nos receptores de estradiol no hipotálamo, o que diminui gradativamente a sensibilidade deste ao efeito inibitório dos esteróides, resultando em aumento na secreção de GnRH e, conseqüentemente, na frequência dos pulsos de secreção de LH (CUNNINGHAM, 2004).

O GnRH atua no lobo anterior da hipófise (adenohipófise), estimulando-a a liberar as gonadotrofinas LH e FSH, tal liberação é influenciada pela mudança na frequência dos pulsos de GnRH (BUTLER et al., 1972; RAHE et al., 1990; REICHLIN, 1992). O FSH é responsável pelo crescimento e desenvolvimento inicial dos folículos. Já o LH é responsável pela luteinização do folículo pré-ovulatório, ocorrendo a formação do corpo lúteo (CL), responsável pela produção de progesterona. A glicose parece estar envolvida com a liberação de LH, o que reflete seu papel na modulação do GnRH (DISKIN et al., 2003). Uma inadequada disponibilidade de utilização da glicose reduz a liberação hipotalâmica de GnRH (WETTEMAN et al., 2003).

3.1.1 Leptina e puberdade

A leptina é uma proteína de 16 kDa constituída por 146 aminoácidos e é sintetizada primariamente pelo tecido adiposo e é secretada na corrente sanguínea após a clivagem de 21 peptídeos sinalizadores de aminoácido (ZHANG et al., 1994). A leptina regula o consumo alimentar, o eixo neuroendócrino e os processos imunológicos (HOUSEKNECHT; PORTOCARRERO, 1998; BARB, 1999).

Nos seres humanos (KIESS et al., 1999), ratos (AHIMA et al., 1997; QUINTON et al., 1999) e novilhas de corte (GARCIA et al., 2002), o aumento na concentração sanguínea de leptina precedeu o início da puberdade. A leptina foi demonstrada como reguladora tanto aguda (AHIMA et al., 1997) como permissivamente (CHEUNG et al., 2001) da entrada em puberdade em roedores. Em humanos, a presença de leptina é um requerimento essencial para obtenção da puberdade (CUNNINGHAM et al., 1999).

Um aumento linear pré-puberal nas concentrações de leptina plasmática foi observado em novilhas de corte (GARCIA et al., 2002, 2003), enquanto em novilhas leiteiras um aumento semelhante foi encontrado em um estudo (DIAZ-TORGA et al., 2001), mas não em outro (BLOCK et al., 2003). Dado que as taxas de crescimento restrito atrasam o início da puberdade em novilhas (YELICH et al., 1995), e que a restrição de nutrientes diminui as concentrações plasmáticas de leptina em bovinos (BLOCK et al., 2003; BROWN et al., 2005), uma relativa deficiência de leptina pode desempenhar um papel no atraso da puberdade de novilhas de crescimento lento.

A expressão do gene da leptina e a leptina circulante são responsivos em curto tempo ao fluxo de nutrientes e estão associados com mudanças na insulina sérica, IGF-1 e pulsatilidade do LH em novilhas pré-púberes (AMSTALDEN et al., 2000). A administração central de leptina recombinante ovina estimulou significativamente a secreção de insulina pancreática e o LH pituitário em vacas em jejum (AMSTALDEN et al., 2000). Essas observações sugerem que a leptina pode representar um papel importante como um sinal ligando o *status* nutricional ao eixo central reprodutivo em fêmeas bovinas (GARCIA et al., 2002).

3.1.2 Sinalização da leptina no hipotálamo

O hipotálamo foi descrito com um sítio chave de ação da leptina, uma vez que os receptores da leptina (*Ob-R*) são localizados dentro de áreas associadas com o controle do apetite, reprodução e crescimento (DYER et al., 1997; LIN et al., 2000). A leptina é um importante sinalizador de saciedade do SNC (CAMPFIELD et al., 1995; HALAAS et al., 1995; PELLEYMOUNTER et al., 1995), pelo menos em parte via inibição da expressão hipotalâmica do NPY (STEPHENS et al., 1995; AHIMA et al., 1996; SCHWARTZ et al., 1996) e secreção (BERGONZELLI et al., 2001). Experimentos conduzidos em animais atribuem à leptina um papel permissivo no momento da puberdade (AHIMA et al., 1997; CHEHAB et al., 1997; CHEUNG et al., 1997; GRUAZ et al., 1998; PLANT, 2001).

O núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) é alvo da atividade da leptina, da grelina, do NPY e da AgRP (proteína relacionada ao agouti), que são peptídeos estimuladores do apetite (MORTON; SCHWARTZ, 2001). O NPY e o AgRP são produzidos pela mesma população de neurônios no ARC e seus efeitos estimuladores de apetite são inibidos diretamente pela leptina.

No entanto, dado o potencial efeito inibitório dos altos níveis endógenos do NPY sobre a atividade do eixo reprodutivo, tem sido proposto que a inibição imposta sobre o eixo gonadotrópico pelas condições desfavoráveis podem ser mediadas pelo concomitante aumento na expressão hipotalâmica de NPY (GRUAZ et al., 1993). O NPY hipotalâmico mostrou-se agir com uma porta neurobiológica de controle da entrada em puberdade, particularmente sob baixas condições metabólicas (GONZALES et al., 2003). A restauração dos níveis normais de leptina circulante durante o jejum agudo, que demonstrou a função gonadotrófica protetora em camundongos adultos pôde ao menos parcialmente resultar em uma inibição induzida pela leptina da expressão do NPY (AHIMA et al., 1996; GRUAZ et al., 1998).

3.2 EFEITO DA NUTRIÇÃO NA OBTENÇÃO DA PUBERDADE

A nutrição é fator determinante em qualquer sistema reprodutivo. Sabe-se que os animais possuem uma sequência fisiológica de utilização da energia ingerida que os induz a utilizá-la primeiramente para a sua manutenção, após para suas atividades físicas e por último

para a atividade reprodutiva (SHORT et al., 1990). Hess et al. (2005) classificam os mecanismos nutricionais que afetam a reprodução em fêmeas bovinas como um enigma, visto que não são mediados por um único nutriente, metabólito ou hormônio.

Segundo Diskin et al. (2003), todos os estudos até aquele momento que avaliaram os efeitos da nutrição sobre o FSH (BOSSIS et al.; 1999; MACKEY et al., 1999; STAGG et al., 2000) indicaram claramente que nem a síntese nem a secreção de FSH são adversamente afetadas pela restrição alimentar crônica ou aguda, e que a falta de FSH não é limitante da ovulação em novilhas com restrição alimentar. Portanto o FSH não é o limitante na obtenção da puberdade em novilhas mal alimentadas.

Uma maior ingestão de energia estimula a secreção do GnRH, o que por sua vez aumenta a síntese e liberação do LH (SCHILLO, 1992).

Em novilhas, a restrição alimentar deprime os níveis de IGF-1 (CATALANO; SIRHAN, 1995). Utilizando dietas de restrição alimentar em novilhas, Bossis et al. (2000) e Stagg et al. (2000) relataram redução linear nas concentrações de IGF-1 do início da restrição até o começo do anestro. Tem sido indicado que o IGF-1 pode afetar diretamente a pituitária (WILSON, 1995) e a função hipotalâmica (HINEY et al., 1991).

A leptina foi descrita como um fator autócrino que interfere na sinalização da insulina (PEREZ et al., 2004) e para supressão, induzida por insulina, na lipogênese em culturas de adipócitos (ELIMAM et al., 2002). Existem receptores para a insulina no cérebro, na glândula pituitária (LESNIAK et al., 1988) e no tecido ovariano (PORETSKY; KALIN, 1987). Conhecimentos atuais indicam que a insulina inibe a secreção de GH e estimula a secreção de LH em roedores e ovelhas (HENRY, 2003).

3.2.1 Leptina e nutrição

A descoberta da leptina tem melhorado nossa compreensão da relação entre o tecido adiposo e a homeostase energética (CAMPFIELD et al., 1995). Quando o consumo de energia e a saída são iguais, a leptina reflete a quantidade de triglicérido armazenado no tecido adiposo. Então a leptina pode servir como um sinal circulante do *status* nutricional ou *adipostat*, proposto primariamente por Kennedy (1953).

Foi inicialmente proposto que a leptina tem um papel primordial como um hormônio anti-obesidade, no entanto, concentrações elevadas de níveis séricos de leptina são

frequentemente associadas à obesidade, sugerindo a presença de resistência à leptina (ZHANG et al., 1994; CONSIDINE et al., 1996; AHIMA et al., 2000). Agindo como um sinal metabólico, a leptina se mostrou capaz de induzir a puberdade em roedores e resgatar camundongos geneticamente obesos da esterilidade (CHEHAB et al., 1997; MOUNZIH et al., 1997).

O jejum em humanos (KOLACZYNSKI et al., 1996) roedores (AHIMA et al., 1996) e porcos (BARB et al., 2001) diminui a secreção de leptina. Além disso, o aparecimento de perturbações nutricionais atrasa a puberdade e interfere com ciclos estrais normais, alterando a função endócrina na égua (BARB et al., 1997), novilha (HOUSEKNECHT et al., 1988) e ovelha (ESTIENNE et al., 1990).

Foram encontradas correlações positivas entre o nível de leptina no plasma e a porcentagem de gordura corporal, em vários modelos, incluindo ovinos (HENRY et al., 2000; NAGATAMI et al., 2000), sugerindo que a restrição nutricional é mediadora da função hipotalâmica ou pituitária via leptina ou seus receptores em ovinos.

Um primeiro passo importante na definição da ação da leptina determinaria se expressão gênica e circulação da leptina são afetadas por irregularidades nutricionais em vacas (AMSTALDEN, 2000). A leptina atua aliada a vários outros neuropeptídeos hipotalâmicos que afetam o consumo de alimentos e o peso corporal (ELMQUIST et al. 1998). A ausência total da leptina ou falta na sinalização pela isoforma longa (*Ob-Rb*) do seu receptor causa obesidade mórbida, diabetes, hipogonadismo, hipotermia e elevação crônica na corticosterona (ELMQUIST et al., 1998).

3.3 RECEPTOR DA LEPTINA (OB-RB) E OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À LEPTINA

Cinco isoformas de receptores da leptina foram clonadas em roedores, chamadas de *Ob-Ra*, *Ob-Rb*, *Ob-Rc*, *Ob-Rd* e *Ob-Re*. As isoformas variam entre si por apresentarem variações no comprimento da região citoplasmática (FONG et al., 1998). O *Ob-Ra* é a isoforma curta do receptor da leptina e está envolvido com a ativação das JAKs (MURAKAMI et al., 1997). Ele é expresso na glândula pituitária, fígado e baço (KAWACHI et al., 2007). O *Ob-Rb* é a isoforma mais longa e participa da via de transdução JAK-STAT (TARTAGLIA, 1997; HANIU et al., 1998). O *Ob-Re* é descrito como um receptor solúvel em

forma circular deficiente em ambos os domínios trans-membrana e intracelular (HUANG et al., 2001). Ambas isoformas, *Ob-Ra* e *Ob-Rc*, são fortemente expressas no plexo coróide e microvasos, atuando no transporte da leptina via barreira hemato-encefálica (BHE) (HILEMAN et al., 2002; BANKS, 2004; BJØRBAEK; KAHN, 2004), também são expressas em tecidos periféricos, atuando na modulação do sinal de transdução da leptina por *Ob-Rb* (WHITE et al., 1997). As isoformas curtas sinalizam pela proteína quinase ativada pelo mitógeno (MAPK) ou fosfotidil inositol-3 (PI-3) vias quinase (BJØRBAEK et al., 1997).

O *Ob-Rb* é expresso no hipotálamo, nos tecidos periféricos (SILVA et al., 2002; MACARRONNE et al., 2003) e na glândula pituitária (LIN et al., 2000; BJØRBAEK; KAHN, 2004). No hipotálamo de ratos ele exerce função no controle do apetite (LOLLMANN et al., 1997).

O *Ob-Rb* pertence à superfamília de receptores de citocinas que ativam a Janus quinase via sinais transdutores e ativadores da transcrição (JAK-STAT) (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

Foi descrita expressão aumentada do receptor no hipotálamo de ovelhas em restrição alimentar (DYER et al., 1997; ADAM et al., 2002).

Vários mecanismos de resistência à leptina foram documentados, incluindo o transporte reduzido de leptina através da barreira hemato-encefálica (SCHUARTZ et al., 1996) e a presença de reguladores negativos da sinalização da leptina, como as proteínas tirosina fosfatases contendo H2 (SHP-2) (CARPENTER et al., 1998) e proteínas tirosina fosfatase 1B (PTP1B) (ELCHEBLY et al., 1999; ZABOLOTNY et al., 2002; CHENG et al., 2002), bem como a família de moléculas dos supressores de sinalização de citocina (HILTON, 1999; YASUKAWA et al., 2000; IRIE-SASAKI et al., 2001).

3.4 NPY

O Neuropeptídeo Y (NPY) foi descoberto e sua sequência de aminoácidos foi descrita na década de 80. Estudando um novo método químico para a detecção de amino peptídeos Tatemoto et al. (1982) isolaram do intestino de suínos dois peptídeos de ocorrência natural o peptídeo HI (PHI) e o peptídeo YY (PYY), que também estão presentes no cérebro (TATEMOTO et al., 1980). No estudo com extrato de cérebro foi isolado um amino peptídeo que achava-se ser o PYY, porém foi descoberto que esse peptídeo possuía diferenças

estruturais e similaridades biológicas com PYY e polipeptídeo pancreático (PP), este peptídeo não caracterizado foi denominado neuropeptídeo Y (NPY) (TATEMOTO et al., 1980).

O NPY é um peptídeo composto por trinta e seis resíduos de aminoácidos e possui uma tirosina como seu resíduo N-terminal, aminotirosina como seu C-terminal e cinco resíduos de tirosina (Y) por molécula (TATEMOTO et al., 1980).

O NPY influencia em inúmeras vias biológicas de regulação do apetite, comportamento alimentar e homeostase energética em humanos (TATEMOTO et al., 1982; WHITE, 1993; WYNNE et al., 2005; ARORA, 2006), regula a pressão sanguínea (BAO et al., 1997) e afeta o ritmo circadiano (WEBER; REA, 1997). A sinalização do NPY no hipotálamo regula os efeitos da leptina na atividade reprodutiva em roedores e primatas (AUBERT et al., 1998; SAINSBURY et al., 2002). Em ratos *ob/ob*, a ausência da inibição de leptina conduz um aumento crônico na expressão de NPY pelo hipotálamo, e o tratamento com leptina reduz o NPY e restabelece a fertilidade (SAINSBURY et al., 2002).

Três diferentes tipos estruturais de NPY mamífero são altamente conservados como neuropeptídeos (OGASAWARA et al., 2008). Ele é expresso em todo o cérebro e é particularmente abundante no núcleo arqueado do hipotálamo durante períodos de subnutrição (KEISLER; LUCY, 1996). O núcleo arqueado é parte do centro da fome no hipotálamo (FUNAHASHI et al., 2003) e contém neurônios que secretam hormônio do crescimento (GHRH) em humanos (CIOFI, et al., 1990) e em bovinos (THOMAS et al., 1999). É especulado que o NPY influencia diretamente o núcleo arqueado, regulando a condição corporal e/ou *status* nutricional via eixo GH (OGASAWARA et al., 2008).

O NPY atua na reprodução exercendo influência sobre a secreção de algumas gonadotrofinas, sendo um potente inibidor da liberação de LH (HOUSEKNECHT et al., 1998). Administrações intra-cerebro-ventriculares de NPY em cabras (ICHIMARU et al., 2001), evidenciaram que o efeito do NPY sobre a secreção de LH é exercido através da sua ação sobre os pulsos de GnRH.

A restrição alimentar aumenta a expressão hipotalâmica do gene do NPY (ADAM et al., 1997), bem como sua secreção, o que é consistente com o papel fisiológico na alimentação (SAHU et al., 1988; BRADY et al., 1990; KALRA et al., 1991). Um balanço energético negativo é sempre associado com a inibição neuroendócrina do eixo reprodutivo em mamíferos (BRONSON, 1986; WADE; SCHNEIDER, 1992; GRUAZ et al., 1993). Em animais ovariectomizados, a infusão do NPY inibe a secreção de LH enquanto que na presença de estrógeno o NPY tem um efeito estimulador na secreção de LH (SCARAMUZZI; MURRAY, 1994).

A infusão central NPY em ratos pré-púberes induz a um atraso da puberdade semelhante àquele induzido pela restrição alimentar (HAMILTON et al., 1986; PIERROZ et al., 1995), enquanto a administração de um antagonista Y1R estimula a secreção precoce de GnRH (EL MAJDOUBI et al., 2000). Estas evidências sugerem que o NPY é um componente do freio pré-puberal na liberação de GnRH e que uma redução na sinalização inibitória do NPY pode dar início a puberdade (EVA et al., 2006).

A interferência do NPY na obtenção da puberdade foi analisada por Vaiciunas et al. (2008), porém a expressão do NPY não foi alterada significativamente. O que não ocorreu com seus receptores NPY-Y1 e NPY-Y4, que se apresentaram menos expressos em no hipotálamo de novilhas mais precoces. A redução na expressão desses receptores sugere que o hipotálamo estaria menos sensível à ação inibitória por parte do NPY.

3.4.1 Receptores do NPY

Os receptores do NPY podem ser distinguidos farmacologicamente de acordo com suas respectivas afinidades pela família de peptídeos NPY-PYY (BLOMQUIST; HERZOG, 1997; GEHLERT, 1998). Eles são receptores acoplados à proteína-G (MICHEL et al., 1998). Cinco deles foram clonados e os subtipos foram definidos como Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6 (MICHEL et al., 1998).

Os receptores NPY-Y1, Y2 e Y5 se ligam preferencialmente ao NPY e PYY, enquanto o NPY-Y4 apresenta seletividade ao PP (LUNDELL et al., 1995; GERALD et al., 1996; WEINBERG et al., 1996).

Entre todos os receptores de NPY, o NPY-Y1 tem recebido uma atenção significativa com base em sua capacidade de estimular o comportamento alimentar (GOBBI et al., 1998; KASK et al., 1998; WISIALOWSKI et al., 2000; MULLINS et al., 2001), inibem nocicepção (ZHANG et al., 1994; NAVEILHAN et al., 2001), regulam a secreção hormonal (KALRA et al., 1992; BESECKE et al., 1994) e modulam o comportamento emocional e resposta ao estresse (BROQUA et al., 1995; HEILIG, 1995). Este receptor foi clonado primeiramente em ratos (EVA et al., 1990; KRAUSE et al., 1992) e posteriormente foi isolado de seres humanos (HERZOG et al., 1992) e camundongos (EVA et al., 1992).

O NPY-Y1 estimula as vias proteína quinase mitógeno-ativadas (MAPK) pela indução à fosforilação da quinase regulada extracelularmente (ERK), efeito que tem demonstrado ser dependente da quinase PI-3 (NIE et al., 1998; MANNON et al., 2000).

O NPY-Y1 está localizado principalmente pós-sinápticamente, embora possa ser encontrado em sítios pré-sinápticos (EVA et al., 2006). Estudos mais recentes em ratos e em camundongos, utilizando sondas específicas de cRNA e técnicas de hibridização *in situ* (KISHI et al., 2005), detectou uma maior quantidade de núcleos positivos, em particular no tálamo, no sistema límbico (hipocampo, amígdala e núcleo da estria terminal) e nas áreas do hipotálamo medial pré-óptica, PVN, DMH, núcleos ventromedial (VMH) e arqueado (ARC).

O NPY-Y1 e o NPY-Y5 foram descritos como atuantes na ingestão de alimentos (CABRELE; BECK-SICKINGER, 2000) e no eixo gonadotrófico. A administração central do antagonista do receptor NPY-Y1 em ratos ou macacos jovens foi reportada estimulando a liberação de LH e adiantando a entrada em puberdade (EL MAJDOUBI et al., 2000; PRALONG et al., 2000). Estes achados são consistentes com a observação que o NPY-Y1 media a inibição do eixo gonadotrófico resultando em alta expressão hipotalâmica de NPY (PRALONG et al., 2002).

3.5 SOCS-3

O supressor da sinalização da citocina (SOCS)-3 é um membro da família das moléculas inibidoras da sinalização da citocina por vários mecanismos, incluindo a inibição de proteínas quinases, bloqueando o acesso dos transdutores e ativadores de transcrição (STAT) aos sítios de ligação receptores e promovem degradação das proteínas de sinalização pela via da ubiquitina (KREBS; HILTON, 2001).

Uma comparação da seqüência primária de aminoácidos dos membros da subfamília SOCS mostrou que pares de proteínas SOCS são mais semelhantes entre si do que outras proteínas SOCS. O domínio SH2 do SOCS-1 é suficiente para a ligação JAK-2, no entanto, ambos os domínios SH2 e os 24 resíduos imediatamente adjacentes ao terminal-N, são necessários para uma alta afinidade de ligação e inibição da atividade JAK-2. Dentro desta região de 24 resíduos N-terminais, SOCS-1 e SOCS-3 exibem homologia em uma seqüência de 12 resíduos que são absolutamente necessários para a inibição da atividade JAK-2 (NARAZAKI et al., 1998; NICHOLSON et al., 1999; YASUKAWA et al., 1999).

Membros da família SOCS podem inibir a sinalização citocina por vários mecanismos diferentes. Muitos estudos mostram que SOCS-1 interage diretamente com JAK-1, JAK-2, JAK-3 e TYK-2 e, com isso, inibe a sua atividade catalítica. SOCS-3 também inibe a atividade JAK-2, no entanto, em comparação com SOCS-1, SOCS-3 se liga a JAK-2 com uma menor afinidade e é um inibidor significativamente menos eficiente (PEZET et al., 1999; MASUHARA et al., 1997; SUZUKI et al., 1998; SASAKI et al., 1999). Ao contrário de SOCS-1 e SOCS-3, CIS e SOCS-2 não ligam, ou inibem o JAKs (PEZET et al., 1999; YASUKAWA et al., 1999).

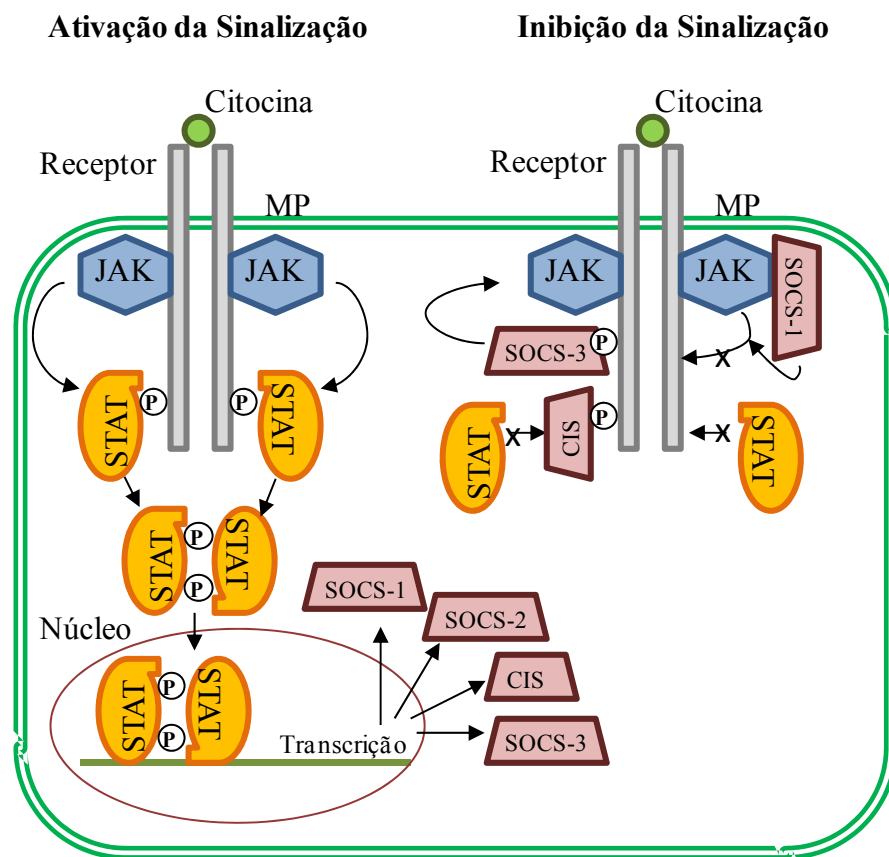


Figura 1 - Mecanismo molecular de regulação negativa da sinalização das citocinas pelas proteínas SOCS. - ocorre estimulação das citocinas ativando a via JAK-STAT, levando à indução de CIS, SOCS-1, SOCS-2 e / ou SOCS-3. Estas proteínas SOCS então inibem as vias de sinalização que, inicialmente, levaram a sua produção. Proteínas SOCS, portanto, agem em parte de um ciclo de *feedback* negativo. CIS, SOCS-1, SOCS-2 e SOCS-3 parecem inibir a sinalização por diferentes mecanismos: SOCS-1 se liga às JAKs e inibe a atividade catalítica, liga o SOCS-3 aos sítios JAK-proximais em receptores de citocinas e inibe a atividade de JAK, CIS e bloqueia a ligação das STATs aos receptores de citocinas. O mecanismo de ação SOCS-2 continua a ser determinado. Adaptado de Krebs (2000)

A administração periférica de leptina em camundongos induz rapidamente o mRNA SOCS-3 nas regiões do hipotálamo (BJØRBAEK et al., 1998). Bjørbaek et al. (1998), descreveram o SOCS-3 como um inibidor induzível pela leptina do sinal de transdução da

leptina. Este inibidor intracelular bloqueou a ativação induzida por leptina dos STAT-3 em células expressando a isoforma longa do receptor da leptina (Ob/Rb) (ENDO et al., 1997; NAKA et al., 1997; STARR et al., 1997; HOWARD et al., 2004; MORI et al., 2004). A atividade excessiva do SOCS-3 tem sido envolvida no desenvolvimento da síndrome da resistência à leptina (BJØRBAEK et al., 1998).

Elmqvist et al. (1998), em um trabalho com hibridização histoquímica *in situ*, demonstraram a distribuição do mRNA do SOCS-3 no hipotálamo médio basal uma hora após a administração intravenosa da leptina e concluíram que ele é rapidamente induzido no hipotálamo. A hibridização mais proeminente foi encontrada no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) e no núcleo dorsomedial caudal do hipotálamo (cDMH), fato confirmado por Baskin, et al. (2000). Um aumento na sinalização do SOCS-3 pode causar sinalização defectiva da leptina no núcleo arqueado (ARH) (ENRIORI et al., 2006). Após a administração de leptina, SOCS-3 é exclusivamente expresso no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, que coexpressa como receptores de leptina e neuropeptídeos, que são considerados essenciais na regulação do consumo (BJØRBAEK et al., 1998).

O mecanismo de ação do SOCS-3 ainda não foi elucidado completamente, sabe-se que o SOCS-3 se liga ao receptor fosforilado da leptina através dos seus domínios homólogos ao Src (SH2) e inibem a atividade tirosina quinase Jak através de sua região quinase inibitória N-terminal, que funciona como um pseudosubstrato (BJØRBAEK, 2000; EYCKERMAN et al., 2000; YASUKAWA et al., 2000). Além disso, o encaixe C-terminal do Socs recruta o sistema ubiquitina-transferase e pode mediar a degradação dos complexos receptores Jak (ALEXANDER, 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAIS E LABORATÓRIOS

O experimento a campo foi conduzido nas instalações do Confinamento Experimental e os abates foram realizados no Matadouro Escola, ambos da Coordenadoria do Campus Administrativo de Pirassununga (CCPS-USP).

As análises moleculares foram realizadas no Centro de Pesquisa em Bovinos (CEPBOV), Laboratório de Genômica Funcional do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VNP-FMVZ-USP), sob responsabilidade do professor Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

4.2 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Foram utilizadas trinta e seis novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*) da raça Nelore, não púberes, com idades entre 18 e 20 meses, e peso vivo médio de 275 Kg. As novilhas foram proporcionalmente divididas em três tratamentos experimentais: dieta de baixa energia sem administração de leptina (BAIXA); dieta de baixa energia com administração de leptina (BAIXA+LEP); e dieta de alta energia sem administração de leptina (ALTA). As dietas BAIXA e BAIXA+LEP eram compostas por silagem de milho, bagaço de cana e concentrado de baixa energia e proporcionaram ganhos médios diários de 0,460 Kg e 0,480 Kg, respectivamente, já a dieta ALTA era composta por silagem de milho e concentrado de alta energia e proporcionou ganho médio diário (GMD) de 1,2 Kg (Tabela 1). A descrição detalhada dos tratamentos nutricionais e do manejo dos animais pode ser encontrada em Carvalho (2009).

Tabela 1 - Grupos experimentais, número de animais por tratamento, tratamento, ganho médio diário (GMD) e dietas.

Grupos Experimentais	N^{o1} de Animais	Tratamento	GMD	Dieta
BAIXA	12	Placebo (Salina)	0,460 Kg	Silagem de Milho Bagaço de Cana
BAIXA+LEP	12	oLeptina	0,480 Kg	[] ² Baixa Energia
ALTA	12	Placebo (Salina)	1,2 Kg	Silagem de Milho [] ² Alta Energia

¹N^o – número; ²[] – Concentrado

4.3 TRATAMENTO HORMONAL, PESAGENS, COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO E ANÁLISE DA PROGESTERONA (P4)

A leptina recombinante ovina (oLeptina) foi importada do *Protein Laboratories Rehovot*, Israel, sob responsabilidade do Dr. Arieh Gertler.

Após 28 dias de adaptação às dietas experimentais, as novilhas do grupo BAIXA+LEP receberam duas injeções subcutâneas diárias de oLeptina: às 06:00 e às 18:00. Os demais animais receberam injeções de solução salina, objetivando submetê-las ao mesmo estresse. A oLeptina foi injetada na dose de 4,8 µg/kg de peso vivo duas vezes ao dia durante 56 dias.

As novilhas foram submetidas à ultrasonografia (USG) para avaliação do tamanho do ovário, mensuração do diâmetro dos folículos e identificação de corpo lúteo (CL) (Figura 2).

O sangue foi colhido por punção venosa jugular em tubos secos estéreis e com vácuo, armazenados em gelo por no máximo duas horas pós-colheita e centrifugados a 1.500 x g por 30 minutos a 4 °C para separação do soro. O soro foi pipetado e armazenado a -20 °C para posterior dosagem de progesterona (P4). As concentrações de progesterona foram determinadas no laboratório de dosagens hormonais da FMVZ-USP, utilizando-se o *kit Coat-A-Count (Diagnostic Product Corp.)*.

As pesagens das novilhas foram realizadas duas vezes por semana durante todo o período experimental.

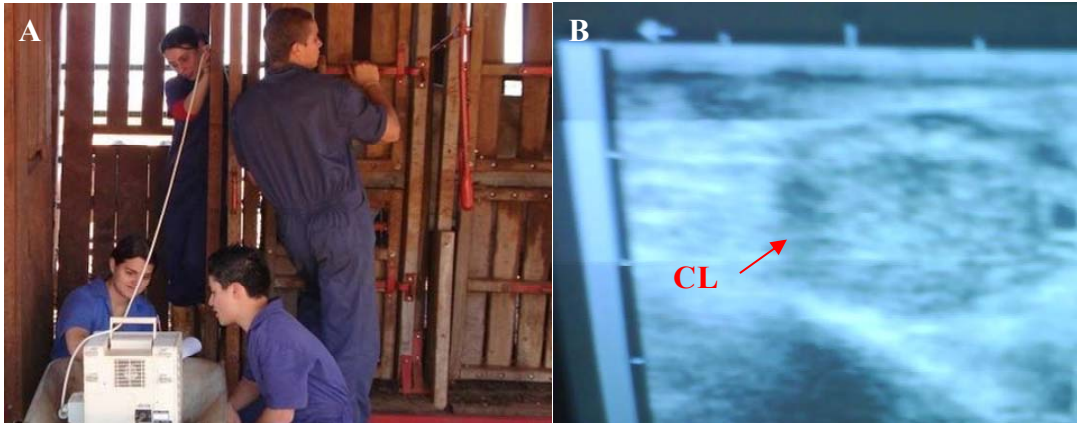


Figura 2 – Ultrassonografia: A) Avaliação das novilhas por USG; B) Imagem do corpo lúteo (CL) no ultra-som

4.4 ABATE DOS ANIMAIS

4.4.1 Critérios de seleção

Das trinta e seis novilhas originais, vinte e quatro foram selecionadas de acordo com a ordem das ovulações. As oito primeiras novilhas a apresentarem sinais de puberdade em cada grupo foram abatidas e o hipotálamo foi colhido para análise molecular. As novilhas foram consideradas púberes quando a concentração progesterona no soro foi superior a 1 ng/mL por duas amostras seguidas, acompanhadas pela presença de CL detectável na USG (Figura 1).

4.4.2 Metodologia de abate e colheita dos tecidos

As novilhas foram abatidas por concussão na medula espinhal com pistola pneumática, caudal ao osso Atlas, com o objetivo de evitar danos ao hipotálamo.

Foi colhida a Glândula Mamária para a retirada de amostras de estroma e parênquima no quarto posterior direito; também foram colhidos os ovários esquerdo e direito, o encéfalo e a pituitária, amostras do fígado, dos tecidos adiposos mesentérico e perirenal. Acima da 11ª costela foram colhidas amostras do tecido subcutâneo e do músculo *Longissimus dorsi*

(contra-filé). Estes tecidos foram armazenados para experimentos futuros, neste experimento somente o hipotálamo será discutido.

Após a retirada do encéfalo procedeu-se a remoção do hipotálamo. O hipotálamo é uma área do diencéfalo que forma o assoalho do terceiro ventrículo e inclui o quiasma óptico, o túber cinério, os corpos mamilares e a eminência média (CUNNINGAM, 2004), tendo ainda como referência o sulco hipotalâmico e a ligação do eixo hipotalâmico-hipofisário (Figura 3).

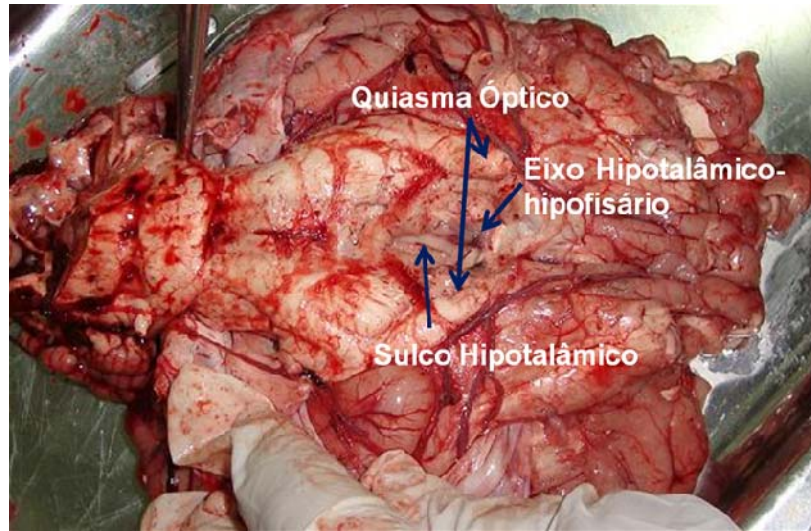


Figura 3 - Vista ventral do encéfalo. Estruturas utilizadas na localização e como referência para a colheita do Hipotálamo

Imediatamente após a colheita de cada tecido, os mesmos foram cortados em pequenos pedaços e colocados em um copo de isopor com Nitrogênio líquido (N-líquido) para congelamento rápido. Em seguida, com a ajuda de uma pinça anatômica, foram colocados em tubos tipo Falcon (15 mL), perfurados com auxílio de um grampo metálico aquecido, identificados com o número do animal, o tipo de tecido e a data do abate (Figura 4). Os tubos foram mantidos em botijão de N-líquido e posteriormente armazenados em ultra-freezer a -80°C.



Figura 4 – Metodologia de amostragem dos tecidos: A) Amostra de fígado picada em pequenos pedaços e tubo Falcon (15 mL) identificado; B) Amostra congelada em N-líquido em copo de isopor; C) Pós-congelamento amostra armazenada no tubo Falcon

4.5 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DO HIPOTÁLAMO

As amostras de hipotálamo das vinte e quatro novilhas selecionadas foram submetidas à extração do RNA total pelo método do Trizol® (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante, que correspondem a uma adaptação da metodologia descrita por Chomczynski e Sacchi (1987). O Trizol protege o RNA contra ribonucleases.

Foram pesados 600 mg de hipotálamo de cada novilha; homogeneizados em cadinho e pistilo com N-líquido; transferidos para tubos tipo Falcon (50 mL) contendo 6,0 mL de Trizol®; homogeneizados em Turraz por 30 segundos. As amostras foram centrifugadas a 4.500 r.p.m. (2.900 x g) por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para 5-6 tubos microtubos de 1,5 mL (1,0 mL por tubo). Os tubos foram estocados em ultra-freezer -80 °C.

Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio, por tubo, em dois tubos de amostra de cada novilha. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e deixados incubando a temperatura ambiente (TA) por 3 minutos. Foram centrifugados a 10.500 r.p.m. (12.000 x g) por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante (~ 0,6 mL) foi transferido para outro tubo de 1,5 mL contendo 500 µL de Isopropanol.

Os microtubos foram incubados a TA por 10 minutos, agitados em vórtex e centrifugados a 10.500 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e a cada tubo foi adicionado 1,0 mL de álcool etílico 75 %. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 8.000 r.p.m. (7.000 x g) por 5 minutos a 4 °C. O álcool foi descartado e os tubos foram deixados invertidos a TA por 15 minutos para secar.

O *pellet* foi dissolvido em 50-80 µL de H₂O_{DEPC} e aquecido em bloco aquecedor por 10 minutos a 55 °C. Os tubos foram agitados em vórtex, colocados em gelo por 1 minuto e centrifugados em centrífuga de bancada. O volume dos tubos foi pipetado múltiplas vezes.

Foram separados 6,0 µL de alíquota, 1,0 µL para a leitura em espectrofotômetro e 5,0 µL para a eletroforese em gel de agarose 1 %. O volume restante foi armazenado a -80 °C.

4.6 LEITURA EM ESPECTROFOTÔMETRO

A leitura em espectrofotômetro objetiva o conhecimento da concentração do RNA extraído e da razão na qual se encontra, sendo um dos parâmetros considerados como padrão de qualidade da amostra ou da extração.

A leitura foi realizada com o aparelho *GeneQuant Pro* (Amersham Biosciences). Foi utilizado 1,0 μL de amostra diluído em 59 μL de água MiliQ ($\text{H}_2\text{O}_{\text{miliQ}}$) e o fator de diluição aparelho foi ajustado para 60. Como referência para leitura, foi utilizada $\text{H}_2\text{O}_{\text{miliQ}}$. Foram anotadas as leituras dos comprimentos de onda A230, A260, A280, a razão 260/280 e a concentração em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

4.7.1 Higienização da Cuba de Eletroforese

Anteriormente a cada eletroforese a cuba foi lavada com detergente neutro; enxaguada com dH_2O ; seca com álcool 70% a temperatura ambiente; deixada por 10 minutos em água oxigenada (H_2O_2); e enxaguada com $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$, deixando-a agir por 5 minutos e descartando-a em seguida; objetivando reduzir ou eliminar os possíveis contaminantes do ambiente, principalmente RNAses, que pudessem interferir nos resultados.

4.7.2 Preparo do Tampão Tris-borato EDTA (TBE) 5X

O tampão tris-borato EDTA (TBE) foi preparado utilizando 4,0 mL de solução de EDTA 0,5 M (pH 8,0), 10,8 g de Hidroximetil Aminometano (TRIS), 5,5 g de Ácido Bórico e mais 120 mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. A solução foi misturada com auxílio de um agitador magnético. O volume foi ajustado para 200 mL com $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$.

4.7.3 Preparo do Gel de Agarose 1%

Foi utilizado TBE 0,5 X para diluir a agarose. A solução foi colocada em um *erlenmeyer* de 250 mL e aquecida em microondas até que a agarose fosse dissolvida por completo. O frasco foi transferido para a bancada. Quando a solução atingiu 55 °C (morno) foi adicionado o corante brometo de etídeo (0,04 µg/mL) e o frasco foi agitado suavemente.

Os lados da cama de eletroforese foram vedados e a solução de agarose foi dispensada na cuba com o pente adequado. Esperou-se a polimerização do gel (30-45 minutos) e colocou-se o TBE 0,5 X até cobri-lo. O pente e as laterais foram removidos.

4.7.4 Aplicação das amostras no Gel

As amostras foram preparadas para a aplicação no gel misturando 5,0 µL da amostra, 2,0 µL de *loading* RNA e mais 3,0 µL de H₂O_{DEPC}. A solução foi aquecida em bloco aquecedor a 85 °C por 10 minutos.

As amostras foram vagarosamente aplicadas nos poços e a fonte de eletroforese foi ligada a 70 Volts, deixando correr do pólo negativo para o positivo por 50 minutos.

4.8 REMOÇÃO DO DNA COM DNASE I

Foram tratados 1,5 µg de RNA cada amostra com *DNase* I, afim de eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, seguindo-se as recomendações do fabricante. O RNA foi incubado com 1 µL de tampão *DNase* I, 1 µL de *DNase* I e 8 µL de H₂O_{DEPC} a TA por 15 minutos. Foi adicionado 1 µL de EDTA (25 mM) e a solução foi aquecida em bloco aquecedor a 65 °C por 10 minutos, para desativar a enzima. As amostras tratadas foram colocadas em gelo por 1 minuto, centrifugadas em centrífuga de bancada e armazenadas em freezer a -20 °C.

4.9 SÍNTESE DO CDNA

As amostras tratadas com *DNase I* foram submetidas a síntese do cDNA, utilizando-se o *kit Superscript II cDNA synthesis* (Invitrogen). Foram utilizados 1,09 µg de RNA de cada amostra como molde da reação de *Transcriptase Reversa* (RT) e tubos controle (-RT), aos quais não foram adicionados a enzima. A todas as reações foram adicionados 1 µL de *deoxyNTP* (10mM) e 1 µL de *oligo* (dT)₁₅₋₁₈ como iniciador. As reações foram incubadas a 65 °C por 5 minutos em bloco aquecedor e colocadas em gelo por 1 minuto, após foram adicionados 2 µL de tampão RT (10 X), 4 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂ – 25 mM), 2 µL de dTT (0,1 M), 1 µL de *RNaseOUT*, incubadas a 42 °C por 2 minutos, colocadas em gelo, em seguida foi adicionado 1 µL de RT às amostras, exceto aos tubos -RT. As amostras foram incubadas a 42 °C por 50 minutos e a síntese foi finalizada incubando-se a 72 °C por 15 minutos e colocadas em gelo. A fita de RNA foi removida do híbrido com a adição de 1 µL de *RNase H*, seguida por incubação a 37 °C por 20 minutos.

As reações foram preparadas para um volume final de 20 µL e a elas foram adicionados 60 µL de etanol absoluto e 2 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 para precipitação. Os tubos foram armazenados *overnight*. A precipitação foi realizada centrifugando as amostras a 11.300 r.p.m. (14.000 x g) por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado com 0,5 mL de etanol 70 %. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 8.000 r.p.m. (7.000 x g) por 5 minutos a 4°C. O etanol foi descartado e os tubos foram deixados invertidos a TA por 15 minutos para secar. O *pellet* foi dissolvido em 50 µL de tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0, pipetando-se múltiplas vezes e a solução aquecida a 55 °C por 10 minutos. Os tubos foram agitados em vórtex, colocados em gelo e centrifugados em centrífuga de bancada.

4.10 DELINEAMENTO DOS PRIMERS

Os *primers*, senso e antisenso, para quantificação da expressão gênica foram delineados, segundo a região codificante das sequências de quatro genes candidatos reconhecidamente envolvidos com a sinalização hipotalâmica da leptina em bovinos: Neuropeptídeo-Y (NPY), seus receptores: NPY-Y1, NPY-Y4, e supressor de sinalização de

citocinas 3 (SOCS-3). A proteína ribossomal L19 (RP-L19) é expressa de forma constitutiva pelos tecidos e foi utilizada como controle positivo de amplificação e para normalizar a quantidade de DNA complementar (cDNA) presente em cada amostra durante o estudo da expressão diferencial de genes, sendo também delineados seus *primers*, segundo a região codificante do gene.

Para tanto foi utilizado o software *Primer Express*® 3.0 (Applied Biosystems). Os *primers* foram avaliados no *Primer BLAST* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index>) e para a seleção dos melhores *primers* em cada sequência foi utilizado o software *OligoAnalyser 3.1* da empresa Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>).

Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen e foram delineados de acordo com as exigências para adequada curva de amplificação e quantificação em PCR em tempo real (qPCR). Os critérios utilizados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Critérios utilizados para delineamento dos *primers*

Parâmetro Avaliado	Mínimo	Máximo
Tamanho Amplicon (pb ¹)	100	150
Temperatura de fusão dos <i>primers</i> (T _m °C)	58	60
Porcentagem de GC (GC% ²)	30	80

¹pb – pares de bases.

²Expressa a porcentagem de bases G e C no *primer*.

Amplicons muito extensos dificultam a quantificação por qPCR e a adequada eficiência da curva padrão e *slope*.

Na tabela 3 estão apresentados os *primers forward* e *reverse* e suas respectivas temperaturas de fusão °C (T_m), porcentagens de GC e números de pares de bases dos genes: NPY, NPY-Y1, NPY-Y4, SOCS-3, RP-L19.

Tabela 3 - *Primers forward* (F) e *reverse* (R) e suas respectivas temperaturas de fusão (T_m), porcentagem de GC (GC%) e números de pares de bases (pb) dos genes: NPY, NPY-Y1, NPY-Y4, SOCS-3, RP-L19

Gene	Sequência 5' - 3'	T _m (°C)	GC%	Nº pb
NPY_F	ACCCCTCCAAGCCTGACAA	59	58	19
NPY_R	TGCCTGGTGATGAGATTGATG	58	48	21
NPY-Y1_F	ACAGGTCCAGTGAAGCCAAAA	58	48	21
NPY-Y1_R	TGGTCCCAGTCAAACACAGTG	58	52	21
NPY-Y4_F	TGGCCTCCACCTGTGTCAA	60	58	19
NPY-Y4_R	GGGACACTCTGCTGGCAAGT	59	60	20
SOCS-3_F	CCAGCCTGCGCCTCAA	59	69	16
SOCS-3_R	CGTCACGGTGCTCCAGTAAA	58	55	20
RP-L19_F	AGGGTACTGCCAATGCTTTAATG	58	43	23
RP-L19_R	CATGTGGCGGTCAATCTTCTT	59	48	21

4.11 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

As reações em cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas com o objetivo de comprovar a qualidade dos *primers* de acordo com a capacidade de amplificação do inserto de cDNA predito.

Para o preparo da reação teste foi feito um *pool* com as amostras de cDNA. O *pool* de cDNA foi descongelado em gelo, aquecido a 55 °C por 10 minutos, agitado em vórtex, esfriado em gelo por 1 minuto e centrifugado em centrífuga de bancada. Foi preparado um *mix*, utilizando-se em cada reação: 1 µL de dNTP (10 mM), 5 µL de tampão de PCR 10 X, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,25 µL de *primer_F* (10 µM), 1,25 µL de *primer_R* (10 µM), 0,25 µL de *Taq* (*Thermophilus aquaticus*) DNA polimerase (5 U/µL) e H₂O_{MiliQ} estéril para completar 49 µL.

A amplificação ocorreu em um volume final de 50 µL, sendo 1 µL de *pool* de cDNA e mais 49 µL do *mix*, utilizando um termociclador PXE 0.2 (Thermo Electron Corporation), com a seguinte programação: 1 ciclo de 94 °C por 45 seg; seguido por 44 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 seg, anelamento a 57 °C por 30 seg e extensão 72 °C por 30 seg; e finalizada com 1 ciclo de 94 °C por 1 minuto, 1 ciclo de 57 °C por 30 seg, 1 ciclo de 72 °C por 1 min e 4 °C infinito.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2% para verificação da existência e comprovação do número de pares de bases dos insertos clonados.

Para a confecção do gel de agarose foi utilizado o protocolo descrito no item eletroforese em gel de agarose, porém foram feitas as seguintes alterações: foi utilizada $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ estéril no preparo do TBE; foram utilizados 5 μL dos produtos da reação de amplificação e mais 1 μL de *loading* DNA no preparo das amostras, sem aquecimento prévio; foi utilizado um marcador (DNA *marker*) no primeiro poço para identificar o tamanho do inserto; os produtos foram vagarosamente aplicados nos poços subsequentes e a fonte de eletroforese foi ligada a 60 Volts, deixando correr do pólo negativo para o positivo por 80 minutos.

4.12 RT-PCR EM TEMPO REAL

As amplificações em PCR em tempo real foram realizadas com o objetivo de quantificar a expressão gênica relativa dos genes candidatos, NPY, NPY-Y1, NPY-Y4 e SOCS-3, quando comparados ao gene referência, RP-L19.

Foram feitas curvas padrão de cada gene com o mesmo *pool* de cDNA do hipotálamo utilizado para as amplificações em termociclador que, através do *slope*, determinaram a eficiência das reações. Para as amplificações em PCR em tempo real foram feitos grupos compostos por duas novilhas de cada por tratamento, formados de acordo com a sequência dos abates (Tabela 4).

As detecções das amplificações por PCR em tempo real foram realizadas no equipamento *StepOne*[®] (Applied Biosystems[®] – Life Technologies do Brasil) utilizando o reagente *SYBR Green master mix 2 X* (Applied Biosystems[®] – Life Technologies do Brasil), composto pelo corante *SYBR Green*, dNTPs, MgCl_2 , tampão e *AmpliTaq Gold*[®] DNA polimerase.

Após padronização, as reações foram definidas como: 10 μL de *SYBR Green master mix 2 X*, 1,2 μL de cada iniciador (5 μM), 6,6 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ estéril e 1 μL de cDNA, seja como amostra ou *pool*, perfazendo um volume final de 20 μL . Em todas as reações foram utilizados controles negativos, contendo $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em duplicatas (curva padrão) ou triplicatas (análise da expressão gênica), em tubos com tampas ópticas transparentes e planas ou em placas com adesivo óptico, que permitem a passagem da luz.

Tabela 4 - Descrição dos grupos de novilhas formados para a análise da expressão gênica em real time

Grupos Real Time	Novilha	Tratamento	Data do Abate
Novilhas 01	1217	ALTA	08/08/2008
	1270	ALTA	15/08/2008
	1191	BAIXA+LEP ¹	08/08/2008
	1124	BAIXA+LEP	05/09/2008
	1187	BAIXA	22/08/2008
	1185	BAIXA	05/09/2008
Novilhas 02	1264	ALTA	22/08/2008
	1273	ALTA	27/08/2008
	1272	BAIXA+LEP	19/09/2008
	1320	BAIXA+LEP	19/09/2008
	1101	BAIXA	05/09/2008
	1058	BAIXA	11/09/2008
Novilhas 03	1337	ALTA	27/08/2008
	1233	ALTA	05/09/2008
	1338	BAIXA+LEP	08/10/2008
	1296	BAIXA+LEP	08/10/2008
	1192	BAIXA	24/09/2008
	1255	BAIXA	14/11/2008
Novilhas 04	1110	ALTA	17/10/2008
	1121	ALTA	17/10/2008
	1303	BAIXA+LEP	10/10/2008
	1171	BAIXA+LEP	21/11/2008
	1333	BAIXA	18/12/2008
	1261	BAIXA	09/01/2009

¹LEP – leptina.

A programação do equipamento foi: 1 ciclo de 95 °C por 10 min, denominado *holding stage*, que tem por função parar a atividade da enzima *Uracil-N-Glicosilase* (UNG), a qual degrada DNA dupla fita contendo uracila; seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg e anelamento a 60 °C por 1 min. Após os ciclos de amplificação, procedeu-se a curva de dissociação que ocorre entre 60 e 95 °C, com ciclos seguintes de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min, colhendo pontos a cada aumento em 0,3 °C na temperatura.

A curva de dissociação consiste na desnaturação dos produtos de PCR de acordo com o aumento na temperatura. Quando o *SYBR* encontra-se 50 % dissociado das fitas duplas e 50 % associado, a temperatura de Fusão (T_m) é gerada, pois, se o fluoróforo não está ligado a fita a fluorescência não é captada. A T_m depende do tamanho do fragmento e do GC%. Mais de uma T_m na mesma amplificação pode indicar amplificação de produtos inespecíficos ou formação de dímeros de primer, quando há excesso do iniciador ou falha em seu desenho (grande região de homologia).

4.13 MICROARRANJOS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS EM SLIDES DE VIDRO (MICROARRAYS)

4.13.1 Delineamento experimental

Uma questão crucial nos experimentos de microarranjos é o número e tipo de repetições a serem utilizados (LEE et al., 2000; KERR; CHURCHILL, 2000; KERR; CHURCHILL, 2001). Cui e Churchill (2003) mostraram a importância de aumentar o número de repetições técnicas (microarranjos) e biológicas (animais) nos experimentos de expressão gênica para que se possa ter maior poder de teste nos efeitos de interesse. Os autores determinaram ser necessário um mínimo de quatro animais e quatro slides por animal, ou seis animais e dois slides por animal, para detectar diferenças maiores que duas vezes entre médias de tratamentos com poder de teste de 0,80.

Trabalhando com dados de expressão gênica de bovinos em microarranjos, Silva (2003) constatou serem necessárias seis repetições biológicas (animais), e duas repetições técnicas (Slide) dentro de cada repetição biológica, para detectar diferenças iguais ou superiores a duas vezes entre tratamentos, com um poder de teste de 0,80.

Com base nos estudos relatados acima, pode-se estimar um mínimo de seis animais por tratamento, com uma hibridização (slide) por animal, para se detectar mudanças maiores que duas vezes na expressão gênica.

Seis hibridizações foram realizadas para cada comparação desejada entre os tratamentos experimentais, em um total de 12 hibridizações (Figura 5).

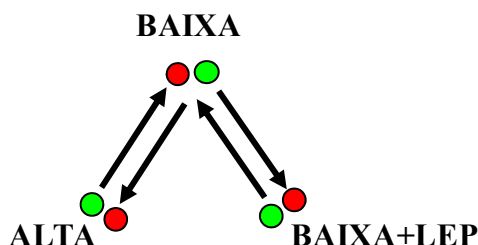


Figura 5 - Delineamento experimental para análise da expressão gênica por microarranjos de oligonucleotídeos. Alexa Fluor 555 = ● e Alexa Fluor 647 = ●. Cada combinação foi repetida 6 vezes num total de 12 hibridizações

A normalização para o efeito de corante foi feita alternando-se os fluoróforos Alexa Fluor (AF) 555 e AF 647 entre os *pools* do mesmo tratamento. As hibridizações e seus respectivos corantes estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Descrição das amostras e corantes utilizados em cada hibridização

Hibridização	AF¹ 555	AF 647
Hib² 01	HA ³ 01	HB01
Hib 02	HB ⁴ 01	HA01
Hib 03	HBL ⁵ 01	HB01
Hib 04	HB01	HBL01
Hib 05	HA02	HB02
Hib 06	HB02	HA02
Hib 07	HBL02	HB02
Hib 08	HB02	HBL02
Hib 09	HA03	HB03
Hib 10	HB03	HA03
Hib 11	HBL03	HB03
Hib 12	HB03	HBL03

¹AF – Alexa Fluor; ²Hib - Hibridização; ³HA – Hipotálamo alta energia; ⁴HB – Hipotálamo baixa energia; ⁵HBL – Hipotálamo baixa energia com leptina.

4.13.2 Preparo das amostras

A análise da expressão gênica por microarranjos foi uma padronização da técnica no Laboratório de Genômica Funcional. Foram preparados *pools* entre os tratamentos, mantendo a significância da análise, mas reduzindo a quantidade de reagentes utilizados.

Foram preparados três *pools* com as amostras de RNA do hipotálamo de cada grupo para a síntese de cDNA e posterior hibridização em microarranjos (Tabela 6). Foram calculadas as quantidades de RNA por amostra e as concentrações foram ajustadas para 1 µg/µL. As amostras foram colocadas em ordem numérica, de acordo com o número das novilhas, para definição e confecção dos *pools microarray*.

Era sabido que para cada síntese de cDNA seriam utilizados 15 µL de cada *pool*, porém como descrito na tabela 5, foram necessários 2 pools de cada tratamentos ALTA, 2 de cada tratamento BAIXA+LEP e 4 pools de cada tratamento BAIXA. Cada *pool* ALTA e BAIXA+LEP foi feito para obtenção do volume final de 36 µL, no caso dos *pools* BAIXA o

volume final foi de 66 μ L (Tabela 6). Os 6 μ L restantes foram utilizados para verificação da qualidade do RNA por gel de agarose-formaldeído 1,2%.

Tabela 6 - Identificação dos *pools* das amostras de RNA do hipotálamo, preparados para a síntese do cDNA, separados por tratamento e descrição das concentrações e volumes ajustados para confecção dos *pools*

Novilha	Tratamento	ID <i>pool</i> <i>microarray</i> ¹	Vol ² Inicial	Conc ³ (ng/ μ L)	Quant ⁴ RNA (μ g)	Vol Final (1 μ g/ μ L)	Vol por amostra	Vol Final <i>pool</i>
1110	ALTA	HA01	19,3	2945	56,7	56,7	12,0	36,0
1121	ALTA		17,3	3946	68,3	68,3	12,0	
1217	ALTA		20,5	3425	70,4	70,4	12,0	
1233	ALTA	HA02	48,3	1090	52,7	52,7	12,0	36,0
1264	ALTA		17,7	4531	80,0	80,0	12,0	
1270	ALTA		19,5	4574	89,0	89,0	12,0	
1273	ALTA	HA03	21,2	3593	76,1	76,1	18,0	36,0
1337	ALTA		48,8	1159	56,6	56,6	18,0	
1124	BAIXA+LEP ⁵	HBL01	11,4	7541	86,0	86,0	12,0	36,0
1171	BAIXA+LEP		21,9	3022	66,1	66,1	12,0	
1191	BAIXA+LEP		15,2	1769	26,9	26,9	12,0	
1272	BAIXA+LEP	HBL02	18,3	4452	81,3	81,3	12,0	36,0
1296	BAIXA+LEP		12,7	7123	90,5	90,5	12,0	
1303	BAIXA+LEP		21,1	3103	65,4	65,4	12,0	
1320	BAIXA+LEP	HBL03	14,1	6398	90,5	90,5	18,0	36,0
1338	BAIXA+LEP		21,6	3348	72,3	72,3	18,0	
1058	BAIXA	HB01	16,4	4291	70,4	70,4	22,0	36,0
1101	BAIXA		18,3	3924	71,8	71,8	22,0	
1185	BAIXA		19,4	2928	56,8	56,8	22,0	
1187	BAIXA	HB02	12,3	6470	79,8	79,8	22,0	36,0
1191	BAIXA		31,1	4169	129,5	129,5	22,0	
1255	BAIXA		13,9	6658	92,5	92,5	22,0	
1261	BAIXA	HB03	13,8	6634	91,8	91,8	33,0	36,0
1333	BAIXA		12,6	6446	81,0	81,0	33,0	

¹ID – identificação (HA – hipotálamo alta energia, HB – hipotálamo baixa energia, HBL – hipotálamo baixa energia com leptina); ²Vol – volume; ³Conc – concentração; ⁴Quant – quantidade; ⁵LEP – leptina.

4.13.3 Gel de agarose-formaldeído (FA) 1,2 %

Foram preparados os tampões de agarose-formaldeído (FA) 10 X, o tampão de corrida do gel FA 1 X e o tampão de carregamento do RNA (*loading* RNA) 5 X. Foram preparados 250 mL do tampão do gel FA utilizando 10,47 g de MOPS-3 (ácido propano sulfônico 3-[N-morfolino]) 20 mM, 1,7 g de acetato sódio 5 mM, 5 mL de EDTA 1 mM e 180 mL de H₂O_{DEPC}; o pH foi ajustado para 7,0 e o volume foi completado para 250 mL com H₂O_{DEPC}. Foram preparados 500 mL do tampão corrida do gel FA 1 X, utilizando 50 mL do tampão gel

FA 10 X, 10 mL de formaldeído 37 % (12,3 M) e 440 mL de H₂O_{DEPC}. Foram preparados 10 mL de *loading* RNA 5X utilizando 25 mg de azul de bromofenol 0,25%, 80 µL de EDTA 0,5 M, pH 8,0, 720 µL de formaldeído 37 % (12,3 M), 2,26 mL de Glicerol 87 %, 3,084 mL de formamida 30,1 %, 4 mL de tampão do gel FA 10 X e o volume completo para 10 mL com H₂O_{DEPC}; o *loading* foi alíquotado em tubos de 1,5 mL. As soluções foram armazenadas em refrigerador.

O gel FA 1,2 % foi preparado em um *erlenmeyer* de 250 mL utilizando 0,6 g de agarose, 5 mL de Tampão FA 10X e o volume completo para 50 mL com H₂O_{DEPC}. A mistura foi aquecida em aparelho de microondas para derreter a agarose; esfriado em banho-maria a 65 °C. Foram adicionados 0,9 mL de formaldeído 37 % (12,3 M) e 1 µL de uma solução estoque de brometo de etídeo 10 mg/mL. A solução foi misturada cuidadosamente e despejada no suporte do gel. Antes de correr o gel foi equilibrado no tampão de corrida do gel FA 1 X por pelo menos 30 min.

Os *pools microarray* foram preparados para a eletroforese em gel FA, adicionando 1,5 µL de *loading* em 6 µL de *pool*. A solução foi misturada incubada por 5 min a 65 °C, esfriada em gelo e aplicada no gel FA equilibrado. O gel foi corrido a 60 V por 50 min.

4.13.4 Síntese do cDNA

Para a síntese, marcação e purificação do cDNA utilizado nas hibridizações foi utilizado o kit *SuperScript™ Plus Indirect cDNA Labeling System* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Os componentes do kit foram agitados em vórtex antes do uso, com excessão das enzimas. As reações foram preparadas em tubos 1,5 mL RNase-free estéreis, adicionando-se 15 µL de cada *pool* de RNA total (1 µg/µL), 2 µL de *anchored oligo(dT)₂₀ primer* (2,5 µg/µL) e 1 µL de H₂O_{DEPC}; os tubos foram incubados a 70 °C por 5 min em bloco aquecedor e colocados em gelo por 1 min. Ainda com os tubos em gelo foram adicionados 6 µL do tampão *first-strand* (5X), 1,5 µL de dTT (0,1 M), 1,5 µL de dNTP mix (incluindo nucleotídeos amino-modificados), 1 µL de RNaseOUT™ (40 U/µL), 2 µL de *SuperScript™ III RT* (400 U/µL); os tubos foram misturados gentilmente e centrifugados rapidamente em centrífuga de bancada, após foram incubados a 46 °C por 3 horas.

Após a incubação procedeu-se a hidrólise e neutralização alcalina, para degradar o RNA original. Foram adicionados 15 µL de NaOH 1 N a cada tubo e misturados

vigorosamente; os tubos foram incubados a 70 °C por 10 minutos. Para neutralização do pH foram adicionados 15 µL de ácido clorídrico (HCl) 1 N, misturados gentilmente.

Procedeu-se a purificação do cDNA *First-Strand*. O tampão de ligação foi diluído em Isopropanol P.A. e o tampão de lavagem foi diluído em Etanol Absoluto P.A. Foram adicionados 700 µL de tampão de ligação aos tubos contendo cDNA *first-strand* da hidrólise e neutralização. Os tubos foram agitados brevemente em vórtex. Os cartuchos foram inseridos nos tubos de colheita e a eles foi adicionada a solução tampão de ligação contendo o cDNA, logo após foram centrifugados a 3.300 x g por 1 min. Os tubos de colheita foram removidos, o filtrado descartado e eles devolvidos aos respectivos cartuchos. Foram adicionados 600 µL de tampão de lavagem aos cartuchos que, posteriormente, foram centrifugados a 12.000 x g por 30 seg. Os tubos de colheita foram removidos, o filtrado descartado e eles devolvidos aos respectivos cartuchos, após foram centrifugados a 12.000 x g por 30 seg. para remover o tampão de lavagem residual. Os tubos de colheita foram removidos e descartados. Os cartuchos foram colocados em tubos de colheita âmbar. Foram adicionados 20 µL de H₂O_{DEPC} ao centro de cada cartucho, sem encostar no filtro, e incubados a TA por 1 min. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 1 min para colher o cDNA purificado.

O cDNA *first-strand* purificado foi concentrado no equipamento Concentrator 3000 (Eppendorf), utilizando rotação e vácuo a 30 °C, por aproximadamente 13 min, até que o volume foi reduzido a 3 µL, gentilmente cedido pelo Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP) sob responsabilidade do professor Dr. Flávio Vieira Meirelles.

4.13.5 Acoplamento ao corante fluorescente

Para o acoplamento ao corante fluorescente, foi necessário manter os tubos contendo cDNA e os frascos de corante protegidos da luz. Foram adicionados 5 µL do tampão de acoplamento 2X aos tubos. Os corantes Alexa Fluor 555 e 647 foram ressuspensos adicionando 2 µL de DMSO (aquecido a TA antes do uso, para evitar a condensação) à seus frascos no momento de sua adição ao tubo correspondente contendo tampão de acoplamento. Os tubos foram agitados em vórtex.

Procedeu-se a purificação do cDNA marcado com fluorescência. As amostras foram protegidas da luz. Foram adicionados 700 µL de tampão de ligação aos tubos contendo cDNA

first-strand acoplado ao corante. Os tubos foram agitados brevemente em vórtex. Os cartuchos foram inseridos nos tubos de colheita e a eles foi adicionada a solução tampão de ligação contendo o cDNA, logo após foram centrifugados a 3.300 x g por 1 min. Os tubos de colheita foram removidos, o filtrado descartado e eles devolvidos aos respectivos cartuchos. Foram adicionados 600 µL de tampão de lavagem aos cartuchos que, posteriormente, foram centrifugados a 12.000 x g por 30 seg. Os tubos de colheita foram removidos, o filtrado descartado e eles devolvidos aos respectivos cartuchos, após foram centrifugados a 12.000 x g por 30 seg para remover o tampão de lavagem residual. Os tubos de colheita foram removidos e descartados. Os cartuchos foram colocados em tubos de colheita âmbar. Foram adicionados 20 µL de H₂O_{DEPC} ao centro de cada cartucho, sem encostar no filtro, e incubados a TA por 1 min. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 1 min para colher o cDNA purificado.

Com o objetivo de avaliar a ligação do cDNA ao corante, foi colhida uma alíquota de 1 µL de cDNA marcado com corante de cada tubo e colocada em outro tubo contendo 9 µL de H₂O_{MiliQ} protegido da luz. A absorbância a 260, 555 e 647 nm e suas respectivas concentrações foram medidas em aparelho espectrofotômetro Biomate 3 (Thermo Scientific), pertencente ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), campus Araras, sob responsabilidade da professora Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini.

O restante da amostra foi precipitado adicionando-se 50 µL de etanol 100% e 2 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2. Os tubos foram incubados a -20 °C *overnight*.

O cuidado com a mínima exposição à luz foi mantido e as amostras foram precipitadas centrifugando-as a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 100 µL de etanol 75 %. Os tubos foram agitados em vórtex e posteriormente centrifugados a 12.000 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram invertidos e secos a TA por 10 min cobertos por papel alumínio. O *pellet* foi ressuspenso em 4 µL de EDTA 10 mM. Os tubos foram armazenados em gelo e mantidos refrigerados.

4.13.6 Preparo das soluções estoque

4.13.6.1 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 20 %

Foram preparados 200 mL de solução SDS 20 %. Foram adicionados 40 g de SDS a 180 mL de dH₂O estéril, aquecida a 68 °C. O SDS foi dissolvido com auxílio de um agitador magnético. O pH da solução foi ajustado para 7,2 adicionando HCl concentrado, foi utilizado um pHmetro Tec 3MP (Technal) para controle da alteração no pH. O volume foi ajustado para 200 mL.

4.13.6.2 Solução Padrão de Citrato Salino (SSC) 20 X

Foram preparados 1.000 mL de SSC 20 X, para tanto, foram diluídos 175,3 g de cloreto de sódio (NaCl) e 88,2 g de citrato de sódio em 800 mL de dH₂O. O pH da solução foi ajustado para 7,0. O volume foi ajustado para 1.000 mL. A solução foi esterilizada em autoclave.

4.13.7 Pré-hibridização

Iniciou-se o preparo dos slides para a hibridização, submetendo-os à pré-hibridização. Foi preparado um novo tampão de pré-hibridização em cada etapa de hibridização. Em um Becker foram adicionados 372,5 mL de dH₂O estéril pré-aquecida a 42 °C, 125 mL de SSC 20 X, 2,5 mL de SDS 20 %, 5,0 g de soro albumina bovina (BSA – Sigma), homogeneizados com o auxílio de um agitador magnético.

Os *slides* foram identificados de acordo com a respectiva hibridização. O tampão de pré-hibridização, aquecido a 42 °C, foi dispensado em uma *high throughput wash station* (ArrayIt® Microarray Technology). Os *slides* foram colocados no suporte da estação de lavagem e mergulhados no tampão de pré-hibridização com agitação em agitador magnético

por 1 minuto, auxiliando na dispersão do DNA livre, logo após foram incubados em estufa a 42 °C por 1 hora. Os *slides* foram lavados em SSC 0,1 X (2,5 mL de 20 X SSC em 500 mL dH₂O estéril), colocado em outra estação de lavagem por 5 min a TA com agitação e após lavados em dH₂O estéril movendo a rack 10 vezes para cima e para baixo. Com o objetivo de melhorar a secagem, os *slides* foram mergulhados rapidamente em isopropanol e, em seguida, colocados em tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 1.500 r. p. m. por 5 min.

4.13.8 Higienização do cassete de hibridização e da Lifter Slip

Os cassetes de hibridização foram lavados com detergente neutro, enxaguados em dH₂O e dH₂O estéril, secos e mantidos em estufa a 54 °C.

As *Lifter-slip* foram higienizadas com mergulhos sequenciais em etanol 95 %, SDS 0,2 % e dH₂O estéril, secas e mantidas em estufa a 54 °C.

4.13.9 Pré-aquecimento do Tampão de Hibridização

O tampão de pré-hibridização *Slide Hyb #1* (Ambion) foi aquecido em banho-maria a 68 °C por 10 min; foi agitado em vórtex até que todo o material precipitado tenha sido dissolvido e mantido em estufa a 54 °C.

4.13.10 Hibridização

As amostras foram mantidas protegidas da luz durante todo o processo de hibridização. As amostras precipitadas e ressuspendidas em EDTA marcadas com AF 555 foram transferidas para tubos correspondentes à hibridização desejada contendo amostras marcadas com AF 647 e homogeneizadas (Tabela 4). Os *mixes* foram transferidos a microtubos de 0,2 mL identificados com a hibridização correspondente. Foi adicionado 1 µL de *yeast* tRNA (Ambion) a cada *mix*. A reação foi aquecida a 95 °C por 10 min em

termociclador. Foram adicionados 51 μL de tampão *SlideHyb* (mantido a 54 °C) a cada reação misturados por pipetagem.

Foram adicionados 150 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{miliQ}}$ a cada nervura da câmara de hibridização pré-aquecida. O *slide* foi colocado na câmara com o DNA impresso para cima, a *lifter-slip* foi posicionada, com a faixa branca em contato com a lateral do *slide*, sobre a área do arranjo impresso. A amostra mantida aquecida foi colocada bem devagar em um lado da *lifter-slip* e deixar dispersar por capilaridade, evitando a formação de bolhas de ar. A tampa do cassete foi colocada rapidamente sobre a câmara, após verificar que a borracha flexível estava assentada uniformemente no canal. Foi aplicada pressão de cima para baixo sobre a tampa do cassete e os parafusos foram firmemente fechados. O cassete foi colocado em banho-maria a 54 °C por 16 horas.

4.13.11 Preparo das soluções de lavagem

A lavagem do *slide* é uma etapa importante no processo de hibridização, pois garante a remoção dos resíduos de tampões, corantes e amostras da superfície do *slide*. As três soluções de lavagem foram preparadas de acordo com os volumes de reagentes descritos na tabela 7, perfazendo volume final de 500 mL em cada. A solução I foi preparada com dH_2O estéril aquecida a 42 °C.

Tabela 7 - Descrição dos reagentes e suas respectivas concentrações, utilizados no preparo das soluções para a lavagem dos slides

Soluções para lavagem	dH_2O¹ estéril	20X SSC²	20% SDS³
Solução I (42 °C)	470,0 mL	25,0 mL	5,0 mL
Solução II	492,5 mL	2,5 mL	5,0 mL
Solução III	497,5 mL	2,5 mL	-----

¹ dH_2O – água destilada; ²SSC – Standard Saline Citrate; ³SDS – Dodecil Sulfato de Sódio.

Os *slides* foram mantidos protegidos da luz no momento de sua remoção da câmara de hibridização, que foi feita com auxílio de pinças estéreis e colocados em placas de *Petri* estéreis contendo solução de lavagem I. As placas foram cuidadosamente agitadas, em movimentos laterais, para remoção da *lifter-slip*. As *lifter-slip* foram removidas e os slides colocados em uma *rack* das estações de lavagem.

As três estações de lavagem foram cobertas com papel alumínio. À primeira foi adicionada solução de lavagem I, à segunda solução II e à terceira solução III. A *rack* com os *slides* foi colocada na solução de lavagem I e a solução foi agitada em agitador magnético à velocidade média por 2 min e 30 seg com a superfície do slide colocada na direção do fluxo do líquido, a *rack* foi girada em 90° e mantida sob ação da solução por mais 2 min e 30 seg. A *rack* foi transferida para a solução de lavagem II e depois para a solução III, repetindo o procedimento utilizado com a solução I.

Os *slides* foram colocados em tubos Falcon (50 mL) e centrifugados a 1.500 r.p.m. por 5 min, com a superfície impressa do *slide* para baixo. Os Falcon foram substituídos por outros lavados em água destilada e secos em estufa, devidamente identificados e cobertos com papel alumínio e armazenados a TA em local protegido da luz.

4.13.12 Escaneamento do Slide

Para proceder o escaneamento o *slide* foi colocado no suporte do aparelho GenePix® 4000B (AXON), com a impressão virada para baixo. Procedeu-se o escaneamento prévio, para visualização da superfície do *array* e marcação da área a ser escaneada. Os blocos foram definidos, através da inserção do número de blocos por linha e quadrante. Para melhorar a imagem, reduzindo a intensidade de manchas e aumentando a qualidade de visualização dos *spots*, foi definido automaticamente o ganho PMT, no qual o *software* faz um escaneamento do *slide*, calcula a intensidade de cada corante e altera o valor da maneira mais adequada. Esse procedimento é repetido por algumas vezes, até que o *software* define os valores mais adequados aos fluoróforos, para melhor nitidez dos *spots*. Ao final da calibragem foi gerado um escaneamento definitivo (Figura 6).

Para proceder a análise do *slide* foi necessário alinhar os blocos e os *spots* (Figura 6). Os dados de cada *slide* foram exportados em arquivos .txt.

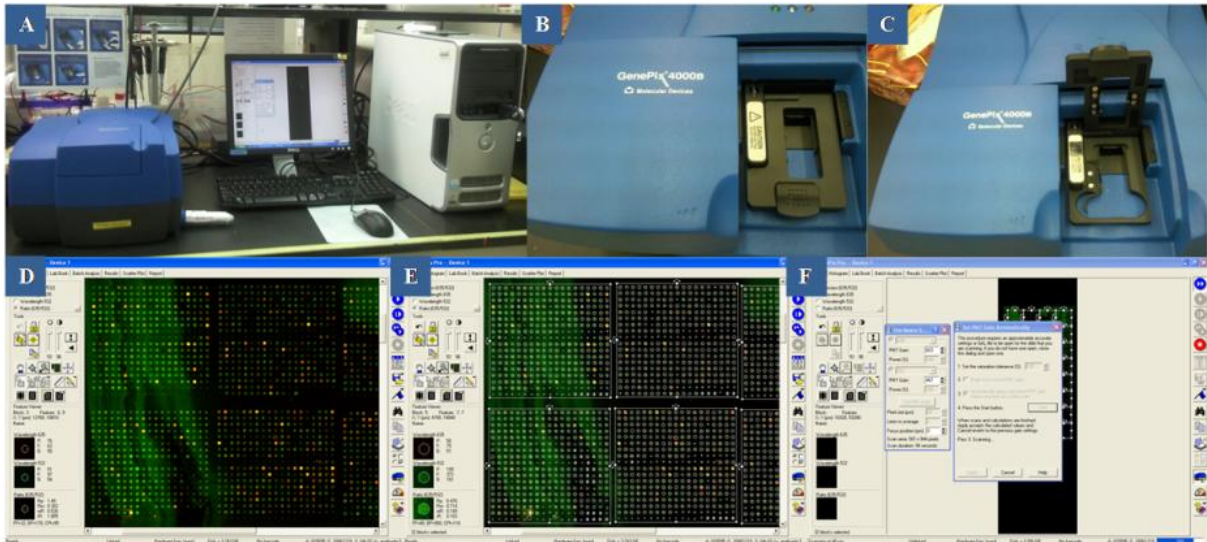


Figura 6 - A) Imagem do *scanner* ligado ao computador; B) *Scanner* aberto, com o suporte fechado; C) Suporte aberto – local onde é encaixado o *slide* com a impressão virada para baixo; D) Imagem ampliada da região escaneada; E) Blocos e spots alinhados; F) Procedimento de ajuste do ganho PMT

4.13.13 Análise estatística

4.13.13.1 PCR em Tempo Real

Os dados de expressão gênica por PCR em tempo-real foram analisados por meio de uma análise de covariância (ANCOVA), segundo modelo proposto por Yuan et al. (2006), considerando os efeitos fixos de tratamento, gene, e a interação do tratamento x gene. Os termos novilha (tratamento) e novilha*tratamento (gene) foram incluídos no modelo como efeitos aleatórios.

Os dados foram analisados quanto à homogeneidade de variância dos resíduos, e observações fora da amplitude de ± 3 resíduos *Studentizados* foram consideradas observações atípicas e retiradas da análise.

Análises de contrastes foram utilizadas para comparar o efeito de tratamentos e para estimativa de $\Delta\Delta C_t$, tão bem como seu erro padrão da média e intervalo de confiança de 95%.

As hipóteses nulas consideradas nos contrastes foram: 1) Efeito da energia: $\text{GeneAlvo}_{\text{ALTA}} - \text{RPL19}_{\text{ALTA}} = \text{GeneAlvo}_{\text{BAIXA}} - \text{RPL19}_{\text{BAIXA}}$, ou alternativamente: $(\text{GeneAlvo}_{\text{ALTA}} - \text{GeneAlvo}_{\text{BAIXA}}) - (\text{RPL19}_{\text{ALTA}} - \text{RPL19}_{\text{BAIXA}}) = 0$; e 2) Efeito da leptina: $(\text{GeneAlvo}_{\text{BAIXA+LEP}} - \text{GeneAlvo}_{\text{BAIXA}}) - (\text{RPL19}_{\text{BAIXA+LEP}} - \text{RPL19}_{\text{BAIXA}})$

Todos os valores de P foram derivados testando a hipótese nula que $\Delta\Delta Ct$ são iguais à zero (0). Então, um pequeno valor de P indica que o $\Delta\Delta Ct$ é significativamente diferente de 0, o qual demonstra um efeito significativo. O desvio padrão da razão foi derivado do desvio padrão do $\Delta\Delta Ct$. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo e a tendência foi considerada como $P < 0,10$.

4.13.13.2 Microarranjos de DNA

Os dados de expressão gênica obtidos por microarranjos de DNA foram analisados segundo metodologia descrita por Madsen et al. (2003). Desvios potenciais devido a intensidade dos corantes nos dados de microarranjos foram visualizados utilizando gráficos de M vs. A , construídos para cada slide, onde razões do Log da intensidade $M = \log(Cy3/Cy5) = \log Cy3 - \log Cy5$ foram plotadas contra as medias do Log das intensidades $A = (\log Cy3 + \log Cy5)/2$ para cada ponta do slide, como descrito por Yang et al. (2002). Normalização específica por slide dos dados foi então conduzida considerando uma técnica de regressão local robusta (CLEVELAND; GROSSE, 1991) utilizando o procedimento LOESS (do inglês *locally-weighted regression and smoothing scatter plots*) do SAS (2001). A eficiência da normalização LOESS foi verificada pela visualização dos gráficos $M - A$ antes e após a normalização. Os dados normalizados foram então transformados de volta antes de continuar as análises estatísticas utilizando-se as fórmulas: $\log Cy3 = A + M/2$ e $\log Cy5 = A - M/2$. O log das intensidades ajustadas por LOESS foram então analisados estatisticamente utilizando um procedimento de modelos mistos de dois passos (WOLFINGER et al., 2001). O primeiro passo envolveu uma normalização especial específica para cada *slide*, e o segundo passo envolveu análises específicas de cada gene, para testar os efeitos de tratamentos na expressão de cada gene individual. O modelo de normalização utilizado para o primeiro passo foi:

$$\log(y_{ijklmn}) = \mu + T_i + C_j + S_l + Q(S)_{lm} + \varepsilon_{ijklmn}$$

onde y_{ijklmn} representa cada sinal de intensidade de fluorescência observado; μ é o valor de média geral, T_i é o efeito principal de tratamento i ; C_j é o efeito principal de corante j ; S_l é o efeito principal de slide l ; $Q(S)_{lm}$ é o efeito do quadrante m dentro do slide l ; e ε_{ijklmn} é o erro estocástico. O segundo passo de análise estatística consistiu de modelos específicos para os

genes para os resíduos estimados obtidos do modelo de normalização discutido acima. Estes modelos foram como descrito abaixo:

$$\hat{\varepsilon} = \mu_k + T_{ki} + C_{kj} + S_{kl} + Q(S)_{klm} + \varepsilon_{ijklmn}$$

onde todos os efeitos tem as mesmas definições do modelo de normalização, exceto que agora são específicos para cada gene carregando um índice adicional k . Estas análises foram computadas utilizando o procedimento MIXED do SAS (2001). Na análise gene-específica, o efeito de tratamento foi declarado significativo se $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO PARA O ABATE

A análise da progesterona foi um dos parâmetros utilizados para o abate das novilhas. Todas as novilhas apresentaram dosagens de progesterona superiores a 1 ng/mL dias antes do abate. Pôde-se verificar que todas as novilhas apresentavam corpo lúteo funcional no momento do abate, como comprovado na dissecação dos ovários das novilhas abatidas (Figura 7).



Figura 7 - Colheita e dissecação dos ovários. Exemplos de corpos lúteos (CL) que comprovaram a ovulação

5.2 PESOS DE ABATE

As novilhas zebuínas entram em puberdade mais tardiamente e mais pesadas que as novilhas taurinas, e que os cruzamentos entre zebuínos e taurinos. Em recente publicação, Silva et al. (2010) realizaram ampla revisão sobre estudos relacionados à obtenção da puberdade em novilhas Nelore. Poucos trabalhos foram encontrados reportando os efeitos da dieta sobre o peso vivo e a condição corporal de novilhas Nelore. Na média dos trabalhos encontrados, as novilhas Nelore atingiram a puberdade com 312 Kg e 22 meses de idade,

enquanto as novilhas cruzadas atingiram a puberdade com 289 Kg e 14 meses de idade (SILVA et al., 2009).

As novilhas do tratamento ALTA apresentaram maior peso médio de abate, 366,0 Kg do que os tratamentos BAIXA e BAIXA+LEP, nos quais as novilhas obtiveram pesos médios de 334 e 330 Kg, respectivamente. Na tabela 8 estão apresentados os pesos das novilhas no dia do abate, classificados por tratamento.

Tabela 8 - Relação dos pesos de abate das novilhas, classificados por tratamento e respectivas datas de abate

Novilha	Data do Abate	Tratamento	Peso (Kg)
1217	8/8/2008	ALTA	339
1270	15/8/2008	ALTA	332
1264	22/8/2008	ALTA	342
1273	27/8/2008	ALTA	354
1337	27/8/2008	ALTA	340
1233	5/9/2008	ALTA	320
1110	17/10/2008	ALTA	455
1121	17/10/2008	ALTA	445
1187	22/8/2008	BAIXA	316
1101	5/9/2008	BAIXA	334
1185	5/9/2008	BAIXA	329
1058	11/9/2008	BAIXA	334
1192	24/9/2008	BAIXA	330
1255	14/11/2008	BAIXA	369
1333	18/12/2008	BAIXA	321
1261	9/1/2009	BAIXA	337
1191	8/8/2008	BAIXA+LEP	310
1124	5/9/2008	BAIXA+LEP	308
1272	19/9/2008	BAIXA+LEP	352
1320	19/9/2008	BAIXA+LEP	324
1296	8/10/2008	BAIXA+LEP	312
1338	8/10/2008	BAIXA+LEP	313
1303	10/10/2008	BAIXA+LEP	358
1171	21/11/2008	BAIXA+LEP	357

5.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA EXTRAÍDO

Para a comprovação da qualidade do RNA extraído e definição da concentração de cada amostra do hipotálamo das novilhas, foram realizadas leituras em espectrofotômetro e eletroforeses em gel de agarose 1 %. A razão ideal para a comprovação da qualidade do RNA

extraído deve ser apresentada em um intervalo de 1,8 a 2,0 quando diluído em tampão TE. Quanto a leitura é feita em água, como neste caso, razões acima de 1,6 indicam pureza de ácidos nucleicos na amostra (SAMBROOK, 2001). Os resultados das leituras dos comprimentos de onda 260 nm, 280 nm, a razão 260/ 280 nm e a concentração em µg/ mL, encontram-se dispostos na tabela 9.

Tabela 9 - Leituras em espectrofotômetro dos comprimentos de onda 260 e 280 nm, razão entre eles e concentrações (µg/ mL) das amostras de hipotálamo das novilhas, separadas por tratamento

Novilha	Tratamento	260 nm	280 nm	Razão 260/ 280	Concentração (µg/ mL)
1110	ALTA	0,435	0,257	1,693	1044
1121	ALTA	0,468	0,268	1,746	1123
1217	ALTA	0,363	0,224	1,621	871
1233	ALTA	0,690	0,400	1,725	1656
1264	ALTA	0,225	0,122	1,844	540
1270	ALTA	0,597	0,355	1,682	1433
1273	ALTA	0,685	0,399	1,717	1644
1337	ALTA	0,674	0,394	1,711	1618
1124	BAIXA+LEP	0,668	0,388	1,722	1603
1171	BAIXA+LEP	0,394	0,248	1,589	946
1191	BAIXA+LEP	0,554	0,316	1,753	1330
1272	BAIXA+LEP	0,467	0,279	1,674	1121
1296	BAIXA+LEP	0,610	0,364	1,676	1464
1303	BAIXA+LEP	0,408	0,246	1,659	979
1320	BAIXA+LEP	0,592	0,347	1,706	1421
1338	BAIXA+LEP	0,399	0,244	1,635	958
1058	BAIXA	0,271	0,152	1,783	650
1101	BAIXA	0,300	0,167	1,796	720
1185	BAIXA	0,255	0,142	1,796	612
1187	BAIXA	0,111	0,065	1,708	266
1191	BAIXA	0,296	0,172	1,721	710
1255	BAIXA	0,268	0,162	1,654	643
1261	BAIXA	0,247	0,139	1,777	593
1333	BAIXA	0,110	0,061	1,803	264

A eletroforese em gel de agarose 1 % permitiu identificar que as bandas estruturais de RNA ribossomal (28 S, 18 S e 5,8 S) apresentavam-se íntegras em todas as amostras de tecido hipotalâmico das novilhas (Figura 8).

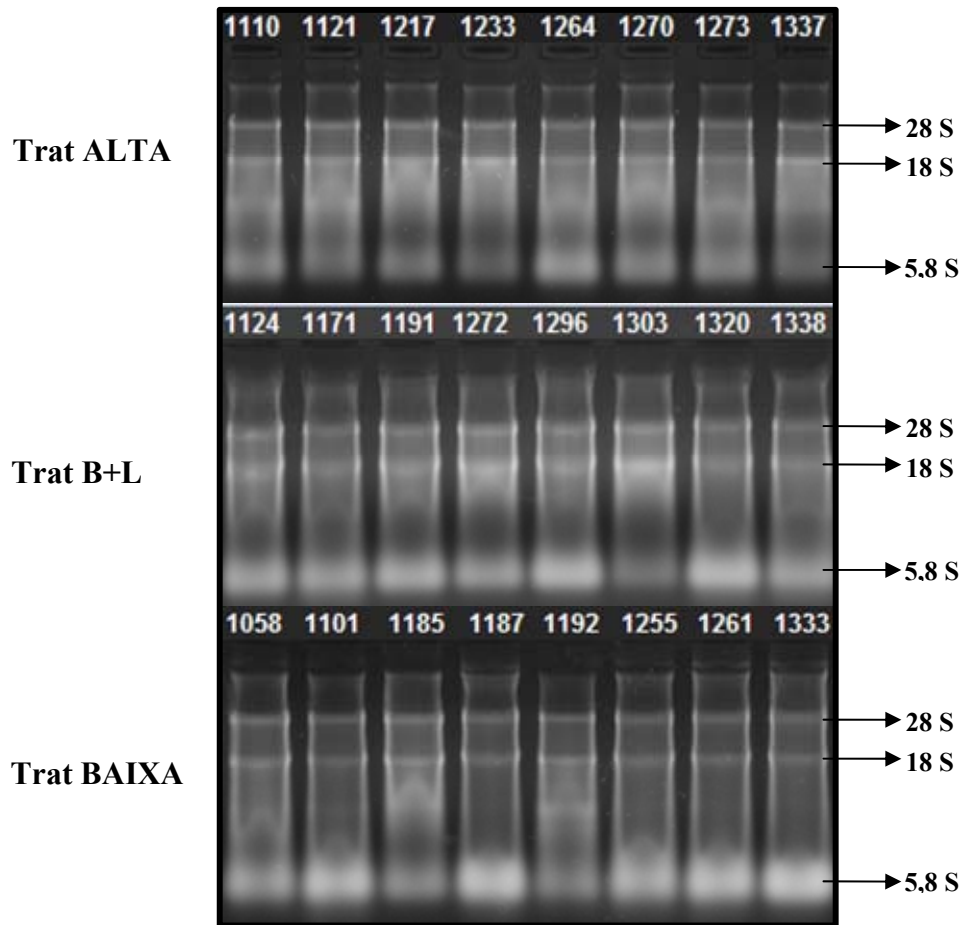


Figura 8 - Avaliação da integridade do RNA extraído utilizando o gel de agarose 1 %, separados por tratamento

Os parâmetros utilizados para avaliar a qualidade do material foram analisados em conjunto. Todas as amostras foram consideradas adequadas para a utilização na síntese do cDNA.

5.4 COMPROVAÇÃO DA QUALIDADE DO PRIMER POR PCR

Para a comprovação da qualidade dos *primers*, de acordo com a capacidade de amplificação do inserto predito, foi corrido um gel de agarose 2 % com amplificações de cada gene NPY, NPY-Y1, NPY-Y4, SOCS-3 e RP-L19. Nos poços 1 e 2 de cada gel estão os *pools* de amostras, e no poço 3 uma reação com controle com água para comprovar a não contaminação do *mix* (Figura 9).

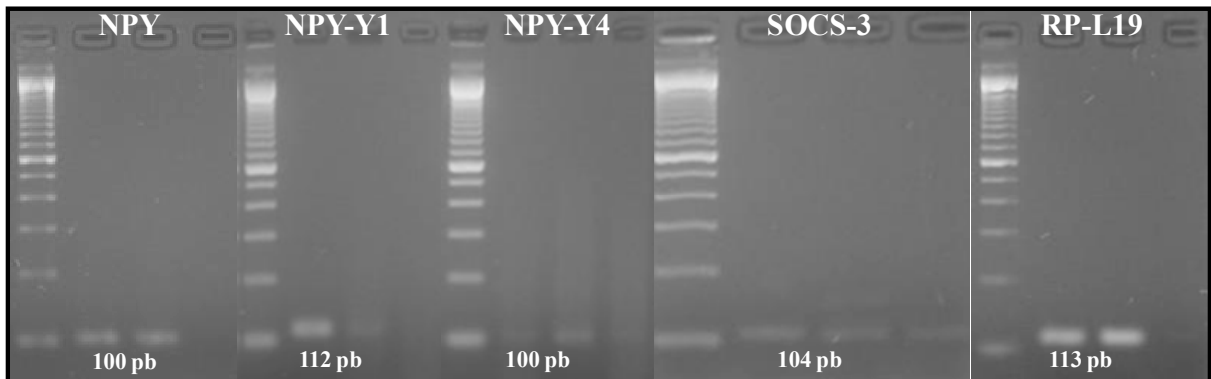


Figura 9 - Géis de agarose 2 % dos genes alvo e do gene controle, comprovando a amplificação dos insertos e seus respectivos número de pares de base

As seqüências esperadas do inserto oriundo do PCR, em cada gene, estão descritas na tabela 10, com seus respectivos números de acesso no GeneBank e números de pares de base (pb).

Tabela 10 - Gene, número de acesso no GeneBank, número de pares de base (pb) e seqüência do *amplicon*

Gene	Nº acesso GeneBank	Nº pb	Seqüência 5' – 3'
NPY	AY491054	100	ACCCCTCCAAGCCTGACAACCCCGGCGAGGACGC TCCGGCGGAGGACTTGGCCAGATACTACTCAGCG CTGCGACACTACATCAATCTCATCACCAGGCA
NPY-Y1	XM_580988	112	ACAGGTCCAGTGAAGCCAAAAGAATCAACATCAT GCTGCTGTCCATCGTGGTGGCGTTTGCCGTCTGCT GGCTGCCTCTCACCATCTTCAACACTGTGTTTGAC TGGGACCA
NPY-Y4	XM_582253	100	TGGCCTCCACCTGTGTCAACCCTTTCATCTATGGC TTTCTCAACACCAACTTCAAGAAGGAGATCAAGG CCCTGGTGCTGACTTGCCAGCAGAGTGTCCC
SOCS-3	NM_174466	104	CCAGCCTGCGCCTCAAGACCTTCAGCTCCAAGAG CGAGTACCAGCTGGTGGTGAACGCAGTGCGCAAG CTGCAGGAGAGCGGCTTTTACTGGAGCACCGTGA CG
RP-L19	XM_587778	113	AGGGTACTGCCAATGCTTTAATGCCCGAGAAGGT AACCTGGATGAGGAGGATGAGAATTCTGCGCCGG CTGCTTACACGATACCGTGAATCTAAGAAGATTG ACCGCCACATG

5.5 PCR EM TEMPO REAL

5.5.1 Avaliação da qualidade de amplificação por PCR em tempo real

Ao testar a eficiência de amplificação de cada gene, foi observada eficiência similar a 100 %, ou seja, inclinações de retas (*slopes*) similares a 3,32, para as curvas de amplificações de todos os genes alvo NPY ($R^2 = 97,6$), NPY-Y1 ($R^2 = 97,4$), NPY-Y4 ($R^2 = 89,1$), e SOCS-3 ($R^2 = 84,0$), e para o gene controle RP-L19 ($R^2 = 98,2$) (Figura 10). Uma reação 100 % eficiente produzirá um aumento de 10 vezes no amplicon do PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ($\log_{2_{10}} = 3,3219$). *Slopes* mais negativos que -3,32 indicam reações com menos de 100 % de eficiência.

Nas figuras 11, 12, 13 e 14, foram representados os genes NPY, NPY-Y1, NPY-Y4 e SOCS-3, respectivamente. As curvas de amplificação, em escala logarítmica, e as curvas de dissociação de cada grupo de novilhas e para cada gene quantificado por PCR em tempo real, foram descritas. A temperatura de fusão (T_m) do gene NPY, registrada na curva de dissociação, foi de 83,6 °C, 81,8 °C para o gene NPY-Y1, 80,0 °C para o gene NPY-Y4 e 83,7 °C para o gene SOCS-3. A presença de apenas um pico na curva de dissociação indica a especificidade na amplificação do gene.

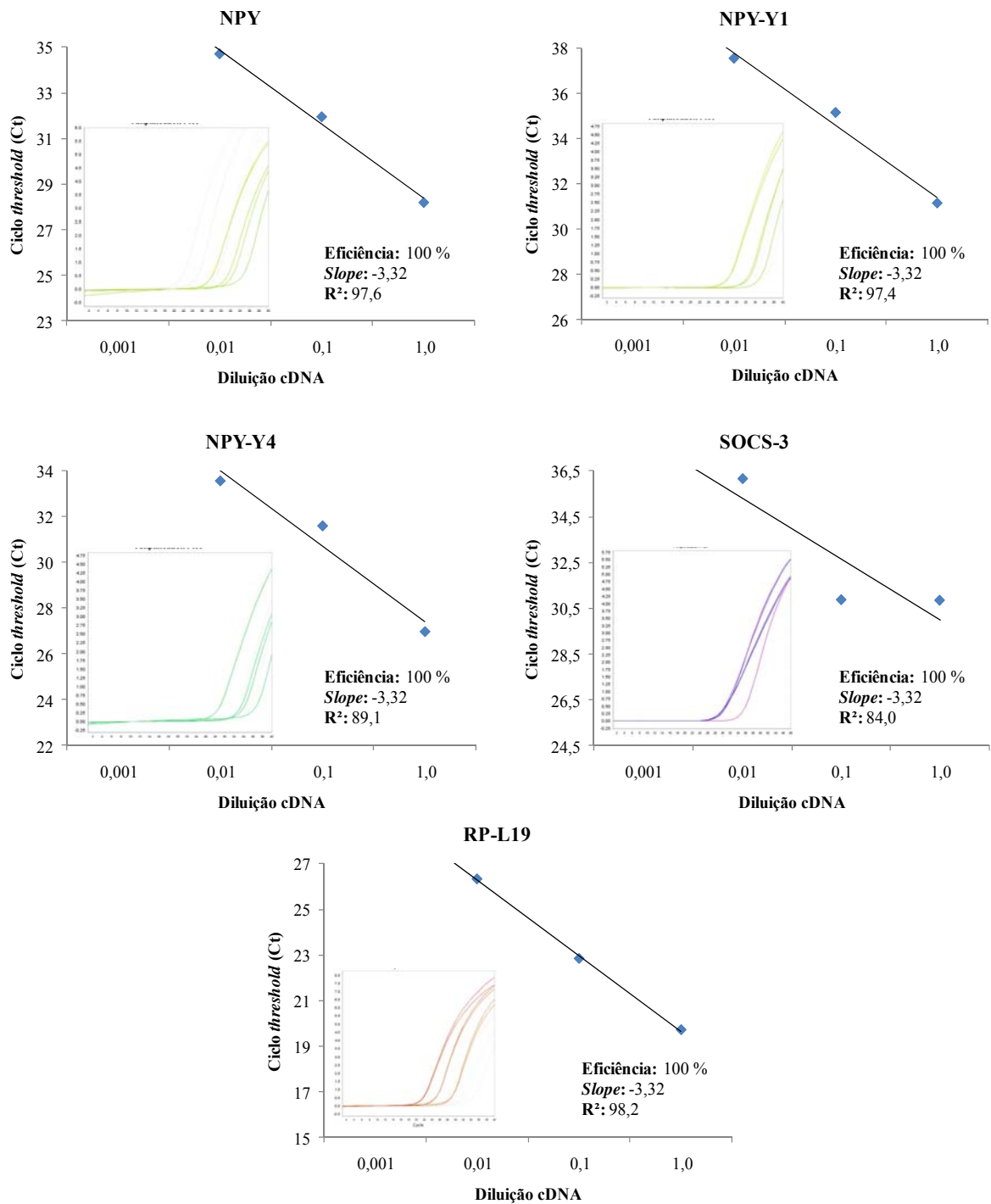


Figura 10 – Curvas de amplificação, gráfico representativo das médias dos ciclos de amplificação, com padrão linear negativo. Dados de eficiência, *slope* e coeficientes de regressão (R^2)

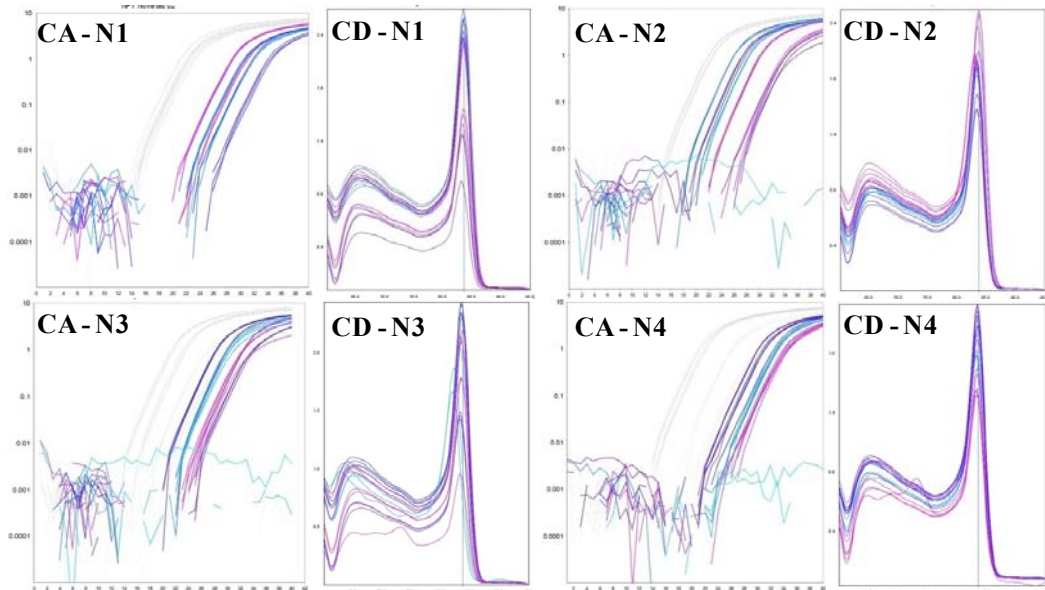


Figura 11 - Gene NPY – Curvas de Amplificação (CA) em escala logarítmica e Curvas de Dissociação (CD), separados por grupos de novilhas (N), utilizados na amplificação em PCR em tempo real

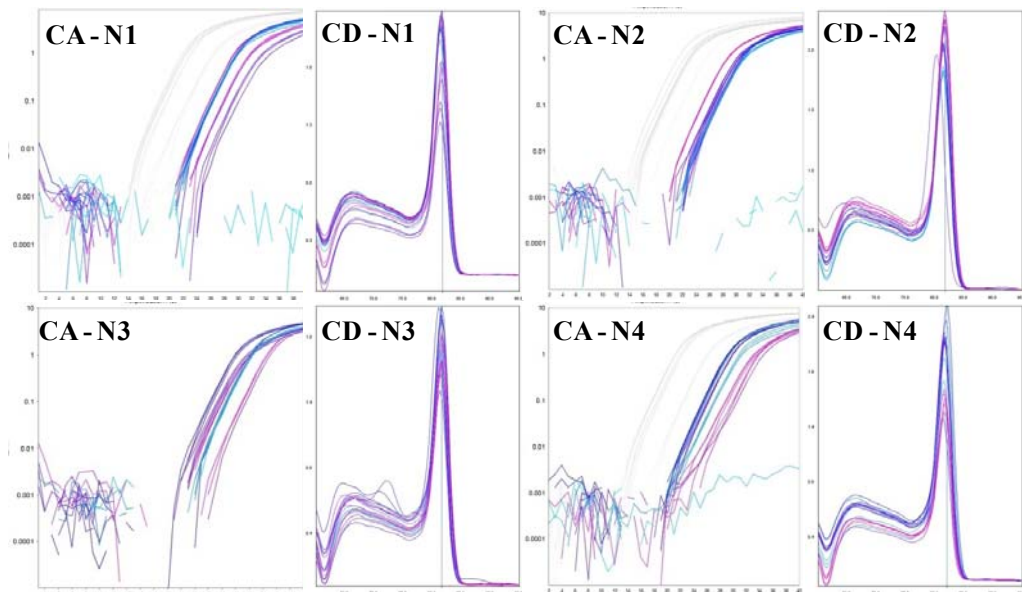


Figura 12 - Gene NPY-Y1 – Curvas de Amplificação (CA) em escala logarítmica e Curvas de Dissociação (CD), separados por grupos de novilhas (N), utilizados na amplificação em PCR em tempo real

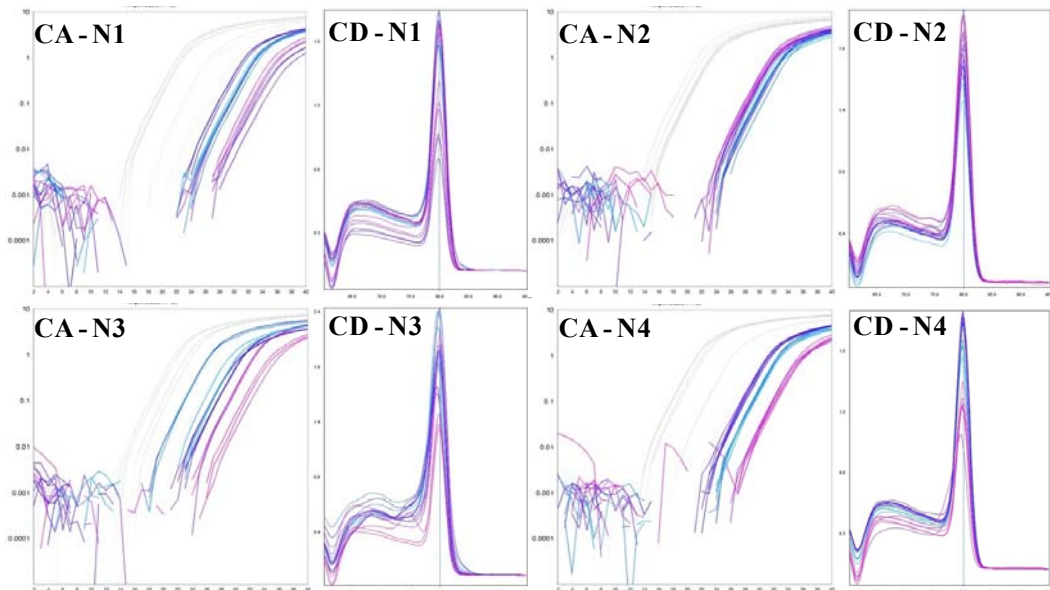


Figura 13 - Gene NPY-Y4 – Curvas de Amplificação (CA) em escala logarítmica e Curvas de Dissociação (CD), separados por grupos de novilhas (N), utilizados na amplificação em PCR em tempo real

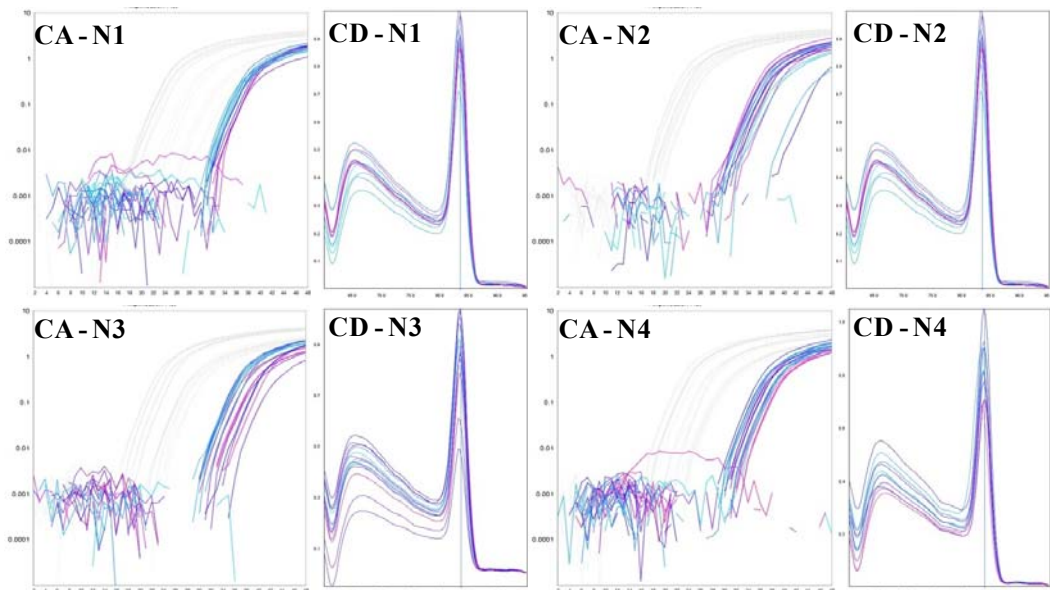


Figura 14 - Gene SOCS-3 – Curvas de Amplificação (CA) em escala logarítmica e Curvas de Dissociação (CD), separados por grupos de novilhas (N), utilizados na amplificação em PCR em tempo real

5.5.2 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real

Em trabalho anterior, Carvalho (2009) não encontrou diferença na idade ou peso vivo à puberdade das novilhas zebuínas submetidas ao tratamento com leptina. No entanto, a

análise da expressão gênica do hipotálamo dessas novilhas identificou alterações na expressão de genes relacionados à entrada em puberdade.

Após o ajuste para as diferenças na expressão do gene controle RP-L19, a expressão gênica relativa dos genes alvo: NPY e seus receptores, NPY-Y1 e NPY-Y4, e do gene SOCS-3 foi detectada por PCR em tempo real. Na tabela 11 estão expressas as médias de ΔCt (gene alvo – gene controle) e os contrastes para efeito de energia da dieta e administração da leptina.

Tabela 11 - Análise do efeito da dieta e da leptina sobre a expressão gênica do Neuropeptídeo Y (NPY) e de seus receptores NPY-Y1 e NPY-Y4 e do supressor da sinalização da citocina (SOCS-3) no hipotálamo de novilhas Nelore

Gene	ΔCt^1			EPM ²	Contraste	
	BAIXA	ALTA	BAIXA+LEP		Energia ³	Leptina ⁴
NPY	-7,1	-7,7	-7,8	1,2	0,751	0,698
NPY-Y1	-5,7	-7,8	-6,8	0,7	0,042	0,275
NPY-Y4	-8,9	-9,1	-8,8	1,0	0,924	0,916
SOCS-3	-11,9	-12,8	-13,5	0,5	0,241	0,050

¹ ΔCt : médias das diferenças entre os ciclos *threshold* do gene controle contra os genes alvo (RP-L19 – alvo); ²EPM: Erro Padrão da Média; ³Energia: contraste ALTA vs. BAIXA; ⁴Leptina: contraste BAIXA+LEP vs. BAIXA.

O NPY é um dos mais importantes e abundantes neuropeptídeos no cérebro de mamíferos (ALLEN et al., 1983; FRIEDMAN; HALLAS, 1998; WILIAMS et al., 2000), onde ele interage com uma família de receptores acoplados à proteína-G (DUMONT et al., 1992; CHENG et al., 1998; MICHEL et al., 1998). Evidências recentes sugerem que o NPY é um componente do freio pré-puberal na liberação de GnRH, e que uma redução na sinalização inibitória do NPY pode dar início a puberdade (EVA et al., 2006). Em apoio a essa hipótese, a infusão central NPY em ratos pré-púberes induz a um atraso da puberdade semelhante àquele induzido pela restrição alimentar (HAMILTON; BRONSON, 1986, PIERROZ et al., 1995), enquanto a administração de um antagonista ao NPY-Y1 (receptor do NPY) estimula a secreção precoce de GnRH (EL MAJDOUBI et al., 2000).

Nossa hipótese era de que o aumento da concentração sanguínea de leptina, seja pelo maior consumo de energia, seja pela infusão subcutânea, poderia acelerar a puberdade reduzindo a expressão do gene NPY ou de seus receptores, NPY-Y1 e NPY-Y4. Entretanto, não houve efeito de dieta, ou da infusão de leptina, sobre a expressão dos genes NPY ($P=0,75$) e seu receptor NPY-Y4 ($P=0,92$; Tabela 11).

Porém, em novilhas alimentadas com dieta de alta energia, a expressão do NPY-Y1 foi reduzida em 4,4 vezes ($P=0,04$) (Tabela 11 e Figura 15). Este resultado sugere que o maior

consumo de energia, ao reduzir a expressão do gene do NPY-Y1, tornaria o hipotálamo menos sensível à ação do NPY, possibilitando a entrada precoce em puberdade.

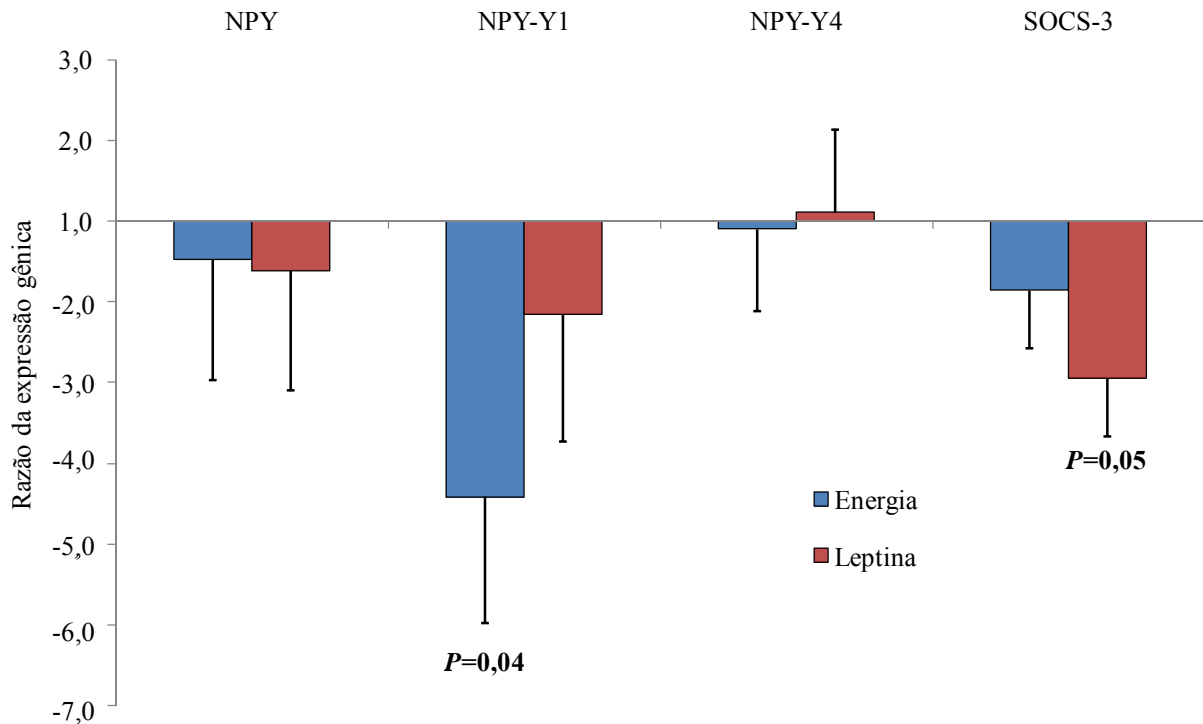


Figura 15 - Razão média da expressão dos genes NPY, NPY-Y1, NPY-Y4 e SOCS-3 em novilhas Nelore pós-púberes. Linhas de barras representam o erro padrão da média. Valores de p significativos estão apresentados em negrito

Os resultados encontrados com o NPY-Y1 nesse experimento corroboram com os encontrados por Vaiciunas et al. (2008), nos quais, esse receptor foi menos expresso no hipotálamo de novilhas geneticamente mais precoces. Assim, analisando em conjunto estes dois trabalhos, conclui-se que tanto novilhas geneticamente mais precoces quanto novilhas alimentadas com maior energia, que consequentemente entram em puberdade mais precocemente, possuem menor expressão do receptor do NPY, chamado NPY-Y1.

Como demonstrado no trabalho de Carvalho (2009), a infusão com leptina por 56 dias, não foi capaz de adiantar a puberdade, apesar de ter um efeito inicial de aumentar o diâmetro médio de folículos dominantes. Tem sido demonstrado que em modelos de obesidade, o excesso de tecido adiposo e de leptina circulante leva a um estado de resistência do hipotálamo à leptina, e o sinalizador SOCS-3 é o principal candidato atuando nesta modulação da resistência à leptina (BJØRBAECK, 2000). Basicamente, a administração de leptina aumenta a expressão de SOCS-3 no hipotálamo, que bloqueia a ativação normal de STAT-3 que ocorreria pela ligação da leptina com seu receptor *Ob-Rb* (BJØRBAECK, 2000).

Em nosso estudo, a infusão com leptina reduziu em média 2,9 vezes a expressão do gene SOCS-3 ($p=0,05$) no hipotálamo de novilhas tratadas por período prolongado (Tabela 11; Figura 15). Não houve efeito da dieta sobre a expressão de SOCS-3 (Tabela 11; Figura 15). Este resultado contrasta com o que é apresentado na literatura, aonde a administração de leptina aumenta a expressão de SOCS-3, levando ao estado de resistência (EYCKERMAN et al., 2000). No entanto, vale salientar que em nosso experimento as novilhas foram abatidas em média 41 dias após o término da aplicação com leptina, uma vez que somente uma novilha ovulou durante o tratamento com leptina.

Assim, é provável que durante o período de infusão com leptina, a expressão de SOCS-3 estivesse elevada, e após o término de infusão, com a redução da concentração sanguínea da leptina, houve queda em sua expressão, levando a uma menor expressão do SOCS-3 à puberdade.

O mecanismo inibitório do SOCS-3 sobre a leptina no hipotálamo não é bem compreendido. Foi descrito que o SOCS-3 se liga ao receptor fosforilado da leptina através de seus domínios homólogos Src (SH2) e inibem a atividade da tirosina quinase Jak, através de sua região quinase inibitória N-terminal, que funciona como um pseudosubstrato (BJØRBAECK, 2000; EYCKERMAN et al., 2000; YASUKAWA et al., 2000). Mori et al. (2004) revelaram, através de análise do hipotálamo de ratos por RT-PCR em tempo real, que o tratamento com leptina trouxe consigo um aumento de duas vezes no mRNA do SOCS-3 em ratos de tipo normal, quando comparados a ratos nocaute com deleção do SOCS-3; entretanto, a expressão de mRNA de SOCS-3 em ratos com deleção foi muito inferior que, em ratos de tipo normal, independentemente da administração de leptina.

5.6 MICROARRANJOS DE DNA

5.6.1 Análise da qualidade e uniformidade do RNA utilizado

Amostras de RNA total do hipotálamo das 24 novilhas selecionada para este estudo foram agrupadas em 9 amostras compostas (*pools*), com 3 *pools* por tratamento (Tabela 6). Para a comprovação da qualidade e uniformidade dos *pools* de RNA, foi corrido um gel de agarose-formaldeído 1,2%, identificando a integridade das bandas estruturais de RNA

ribossomal (28 S, 18 S e 5,8 S) em todas as amostras de tecido hipotalâmico das novilhas (Figura 16). Nota-se também a uniformidade da intensidade das bandas, indicando similaridade da quantidade de RNA total em cada *pool* (Figura 16).

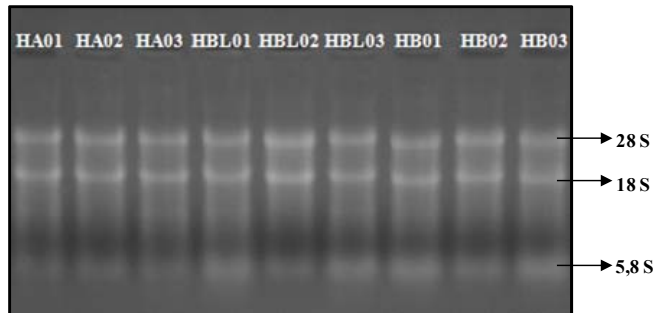


Figura 16 - Gel de agarose-formaldeído dos *pools microarray*.
HA – hipotálamo ALTA; HBL – hipotálamo
BAIXA+LEP; HB – hipotálamo BAIXA.

5.6.2 Correção dos possíveis desvios devido aos corantes dos dados de microarranjos

Os possíveis desvios devido à ação do corante em cada *slide* foram visualizados utilizando gráficos de M vs. A . Foi realizada uma normalização específica por *slide* dos dados considerando uma técnica de regressão local robusta (CLEVELAND; GROSSE, 1991) utilizando o procedimento LOESS do SAS (2001). A eficiência da normalização LOESS foi verificada pela visualização dos gráficos $M - A$ antes e após a normalização (Figuras 17; 18).

Das doze hibridizações realizadas, quatro não puderam ser utilizadas devido a problemas na imagem, como manchas muito acentuadas e intensidade muito baixa ou ausente de fluorescência. Na figura 17 estão descritos os dados dos gráficos M vs A antes e após a normalização dos cinco slides hibridizados corretamente para o contraste energia. Três slides foram utilizados na análise para o contraste leptina e seus gráficos M vs A não normalizados e normalizados estão descritos na figura 18.

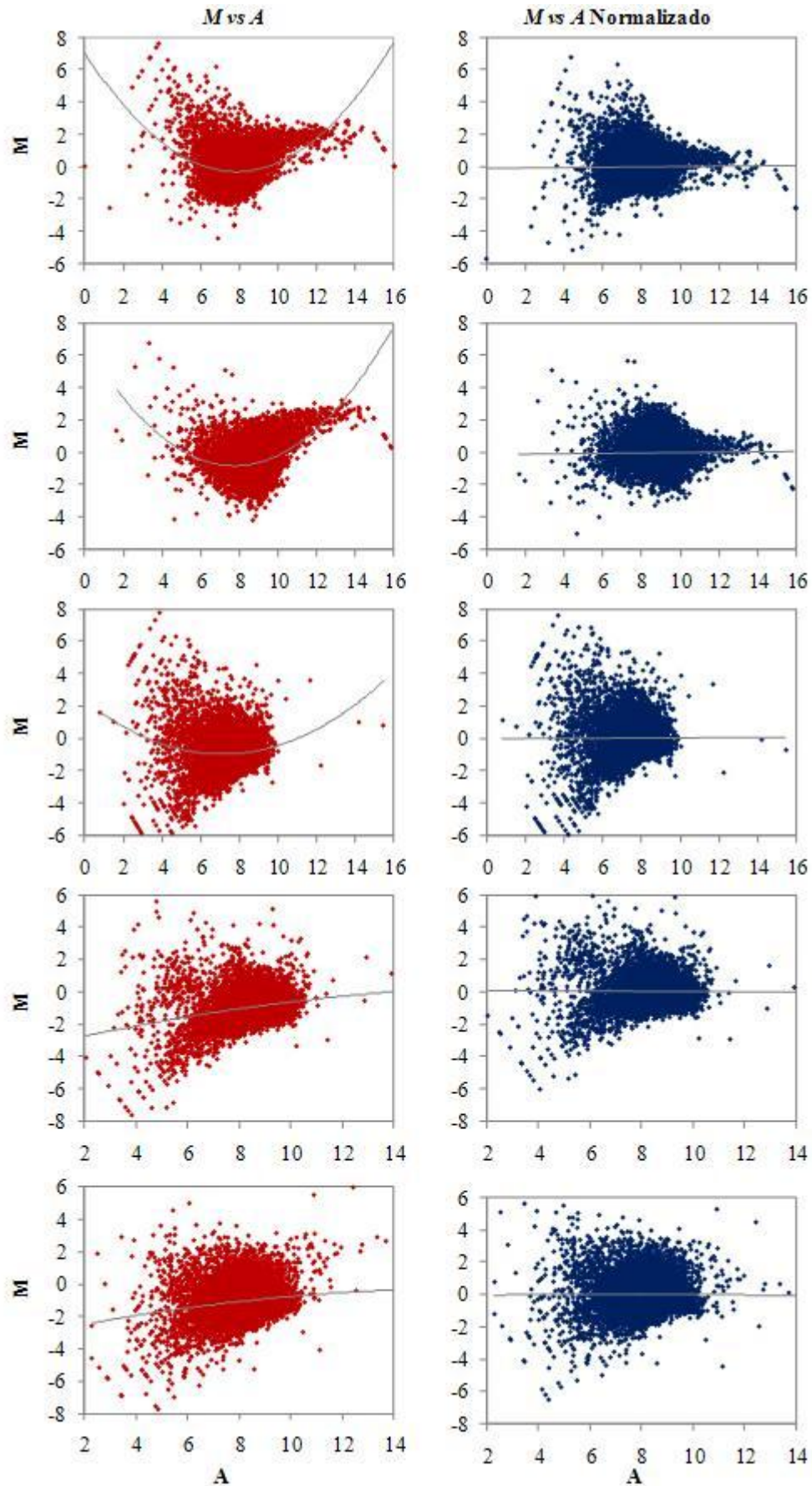


Figura 17 - Contraste Energia - Gráficos M vs A dos desvios dos dados devido ao corante de cada slide e gráficos M vs A após normalização dos dados por LOESS

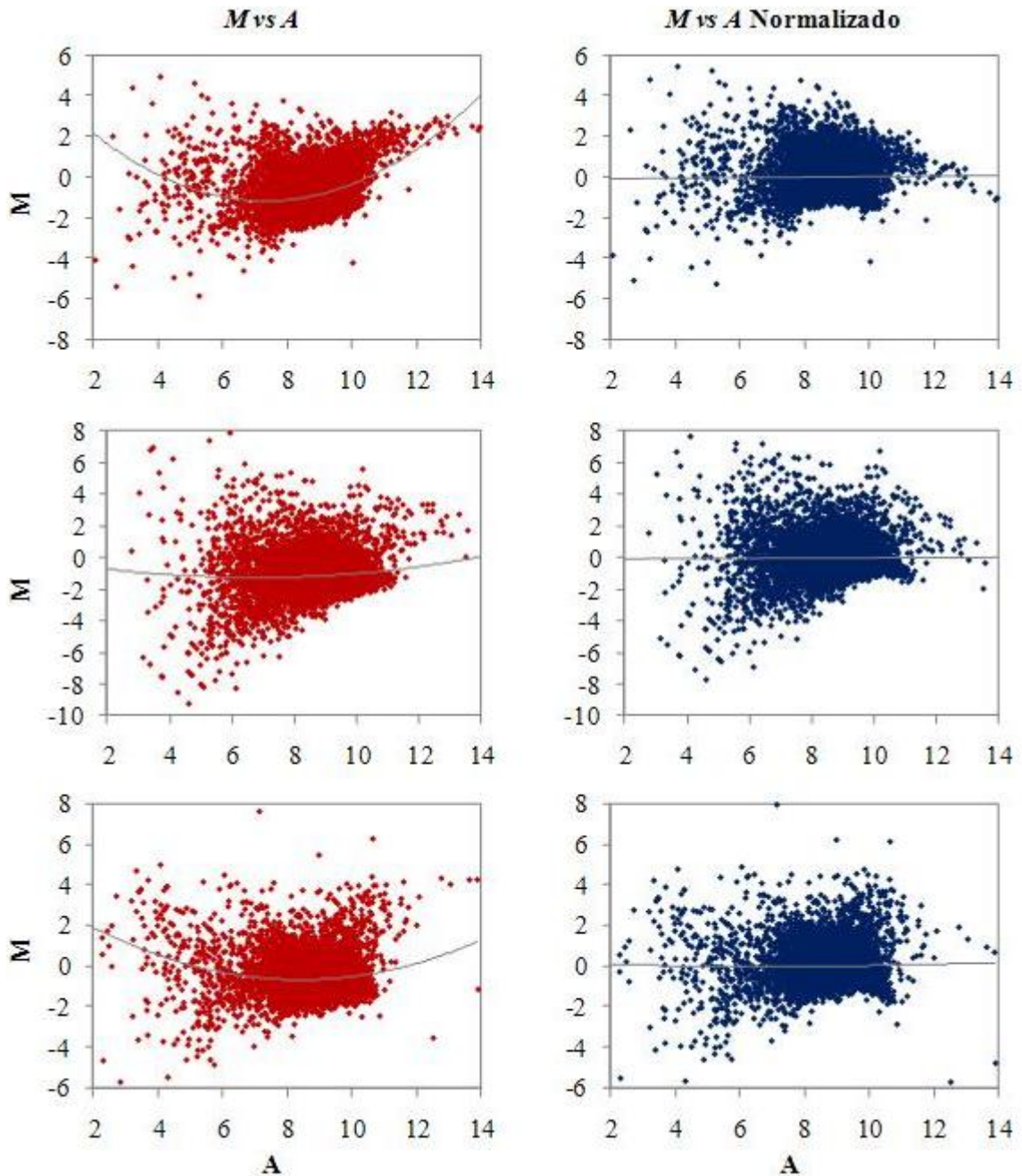


Figura 18 - Contraste Leptina - Gráficos M vs A dos desvios dos dados devido ao corante de cada slide e gráficos M vs A após normalização dos dados por LOESS

Os logs das intensidades ajustadas por LOESS foram então analisados estatisticamente utilizando um procedimento de modelos mistos de dois passos (WOLFINGER et al., 2001). O primeiro passo envolveu uma normalização especial específica para cada *slide*, e o segundo passo envolveu análises específicas de cada gene, para testar os efeitos de tratamentos na expressão de cada gene individual.

5.6.3 Quantificação da expressão gênica por microarray

A análise por microarranjos de DNA é uma análise genérica que objetiva direcionar o estudo de genes específicos. Em cada *slide* havia quatro quadrantes compostos por 2.360 genes cada, entre alvos e controles, como demonstrado na figura 19.

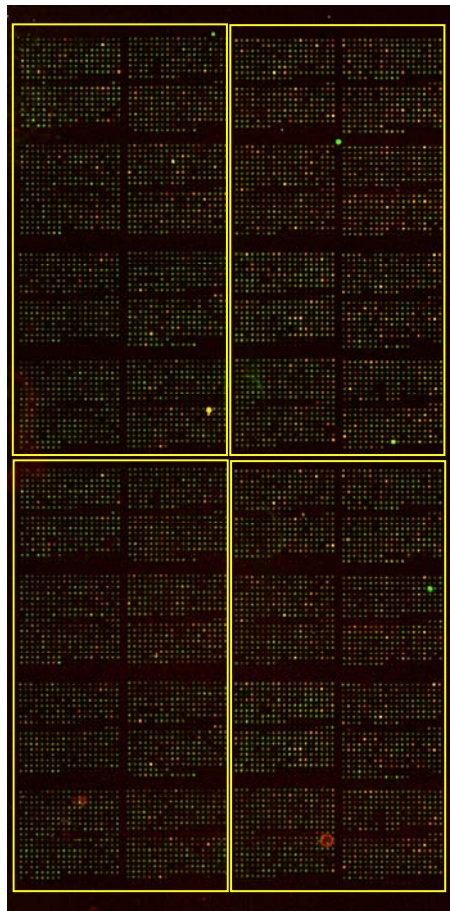


Figura 19 - Slide escaneado, com os 4 quadrantes divididos

Foram encontrados 78 genes cuja expressão foi alterada pela densidade energética da dieta ($P < 0,05$) no hipotálamo das novilhas Nelore, destes foram selecionados os que apresentaram razões de expressão da ordem de 1,4 ou mais, totalizando 20 genes (Tabela 12). As diferenças nas intensidades obtidas na análise estatística foram convertidas em razão de expressão ($2^{\text{diferença na intensidade}}$), valores menores que 1 foram convertidos em expressões negativas.

Tabela 12 - Relação dos genes diferencialmente expressos no contraste energia, classificados pela função biológica, com os respectivos símbolos, função biológica depositada no Gene Ontology (GOBiol), razão, erro padrão da média (EPM) e probabilidade

Identificação	Nome do Gene	Símbolo	GOBiol	Razão	EPM	Prob. Valor P
NM_175809.1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1, 7kDa	NDUFB1	carbohydrate metabolism	1,45	0,25	0,04
CK836846	LIM domain binding 1	LDB1	cell adhesion	-1,40	0,19	0,02
Bauman1921	YEATS domain containing 4	YEATS4	cell growth and or maintenance	-1,63	0,26	0,01
NM_205807.1	sialyltransferase 9	SIAT9/ ST3GAL3	chromatin modification	1,47	0,25	0,04
CK979365	DiGeorge syndrome critical region gene 6-like	DGCR6L	development	1,79	0,33	0,02
NM_174243.2	arrestin, beta 1	ARRB1	electron transport	1,40	0,22	0,04
CB166058	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	LRP8	fat body developmen	1,65	0,29	0,02
M15886.1	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)	DBI	lipid metabolism	1,59	0,18	<0,01
NM_177943.1	SEC14-like 2 (S. cerevisiae)	SEC14L2	metabolism	-1,43	0,19	0,01
CK955028	SMART/HDAC1 associated repressor protein	SHARP/ SPEN	morphogenesis	-1,65	0,30	0,02
NM_176855.1	oxytocin, prepro-(neurophysin I)	OXT	protein biosynthesis	-1,71	0,27	0,01
CK974571	heat shock 27kDa protein 1	HSPB1	protein folding	1,41	0,19	0,01
NM_176660.2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7, 18kDa	NDUFB7	regulation of transcription, DNA-dependent	1,41	0,22	0,04
AW447459	zinc finger protein 38	ZNF38	signal transduction	1,44	0,25	0,04
NM_174647.2	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein, DARPP-32)	PPP1R1B	signal transduction	-1,57	0,30	0,04
NM_174693.1	diacylglycerol O-acyltransferase homolog 1 (mouse)	DGAT1	signal transduction	1,59	0,31	0,04
CB425801	GLI-Kruppel family member GLI3 (Greig cephalopolysyndactyly syndrome)	GLI3	transport	-1,52	0,23	0,01
NM_174762.1	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6	UGT1A6	transport	-1,40	0,16	0,01
NM_174220.2	tyrosyl-tRNA synthetase	YARS	-	-1,43	0,20	0,02
U92434.1	B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	-	-1,41	0,18	0,01

Os genes diferencialmente expressos detectados no contraste energia possuem funções distintas e expressões diferenciadas. Foram encontrados genes envolvidos no sinal de transdução, metabolismo de carboidratos, metabolismo de lipídeos, crescimento celular ou manutenção, desenvolvimento, morfogênese, regulação na transcrição, transporte intracelular, transporte de elétrons, fosforilação oxidativa e adesão e migração celular. É importante salientar que as novilhas recebendo a dieta com alta energia entraram em puberdade mais cedo e com maior peso vivo ao abate do que novilhas com baixa energia (CARVALHO, 2009).

Dentre os genes diferencialmente expressos, se destaca o gene da β -arrestina 1 (ARRB1), que foi 1,40 vezes mais expresso ($P = 0,04$) em novilhas submetidas à dieta de alta energia. As isoformas 1 e 2 da β -arrestina são proteínas citosólicas amplamente expressas que são recrutadas para mediar a dessensibilização dos receptores acoplados à proteína-G (GPCRs)1, como os receptores de NPY, ao se ligarem a um agonista (MCDONALD et al., 2001). Estas isoformas causam amortecimento de respostas celulares específicas a estímulos como os hormonais, neurotransmissores, ou sinais sensoriais.

As β -arrestinas se ligam às formas ativadas de receptores acoplados à proteína-G, inibindo a continuidade da interação com proteínas G, e ao invés, conectam o receptor a proteína de superfície claterina. Vesículas cobertas por claterina são componentes essenciais do maquinário de internalização, e após a internalização, os receptores são reciclados à superfície celular ou degradados em lisosomos (BERGLUND et al., 2003).

Foi demonstrado anteriormente que os receptores NPY-Y1 se associam de forma eficiente com β -arrestina, com uma correspondente influência sobre dessensibilização e internalização do receptor (BERGLUND et al., 2003; HOLLIDAY et al., 2005; OUEDRAOGO et al., 2008).

A hipótese que surge de nossos dados de aumento da expressão da β -arrestina 1 com maior consumo de energia é a de que a elevação de β -arrestina 1 no hipotálamo levaria a maior internalização dos receptores de NPY, diminuindo a sensibilidade do hipotálamo ao NPY e conseqüentemente adiantando a puberdade. Este resultado se alia ao obtido por PCR em tempo-real, com menor expressão do NPY-Y1 em novilhas com maior consumo de energia, e fortalece esta via como sendo importante para modulação da aceleração da puberdade com maior consumo de energia. No entanto, os resultados obtidos com microarranjos precisam ser comprovados por PCR em tempo real antes que estudos de expressão gênica mais aprofundados possam ser feitos.

Para o contraste leptina foram encontrados 134 genes com expressão significativa ($P < 0,05$), da mesma forma que o contraste energia, foram selecionados os genes que apresentaram razões superiores a 1,4, totalizando 80 genes, dos quais, 18 genes tiveram a expressão reduzida (Tabela 13), e 62 tiveram a expressão aumentada pela aplicação de leptina (Tabela 13).

Tabela 13 - Relação dos genes cujas expressões foram reduzidas com a aplicação de leptina, classificados pela função biológica, com os respectivos símbolos, função biológica depositada no Gene Ontology (GOBiol), razão, erro padrão da média (EPM) e probabilidade

Identificação	Nome do Gene	Símbolo	GOBiol	Razão	EPM	Prob. Valor P
CK980929	N-acetylgalactosaminidase, alpha-	NAGA	carbohydrate metabolism	-1,42	0,12	<0,01
CK773860	v-src sarcoma viral oncogene homolog	SRC	cell growth and or maintenance	-1,64	0,33	0,04
NM_174435.1	protein kinase C, alpha	PRKCA	cell surface receptor linked signal transduction	-1,90	0,30	<0,01
NM_174242.2	apolipoprotein A-I	APOA1	cholesterol metabolism	-1,57	0,29	0,03
CB468243	transcription factor 12	TCF12	development	-1,57	0,23	0,01
NM_173968.2	thioredoxin	TXN	electron transport	-1,44	0,19	0,01
NM_173943.2	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	NNT	energy pathways	-1,63	0,23	<0,01
CB468421	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1, 8kDa	NDUFA B1	fatty acid biosynthesis	-1,61	0,30	0,03
NM_174448.2	RAP1A, member of RAS oncogene family	RAP1A	negative regulation of cell cycle	-1,92	0,37	0,02
CK777978	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase1	PRPS1	nucleoside metabolism	-1,41	0,18	0,01
CK838207	mitogen-activated protein kinase kinase 7 interacting protein 2	MAP3K7 IP2	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	-1,44	0,19	0,01
CK834254	activity-dependent neuroprotector	ADNP	regulation of transcription, DNA-dependent	-1,43	0,25	0,05
CK976696	PHD finger protein 1	PHF1	regulation of transcription, DNA-dependent	-1,42	0,17	<0,01
BE667266	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	SLC20A1	transport	-1,45	0,22	0,02
M15886.1	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)	DBI	transport	-1,42	0,22	0,03
CK846328	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyl-transferase 5	B3GNT5	-	-1,64	0,34	0,04
CK941894	beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1	BCMO1	-	-1,49	0,20	0,01
NM_175820.2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex	NDUFA4	-	-1,48	0,26	0,04

Tabela 14 - Relação dos genes cujas expressões foram elevadas com a aplicação de leptina, classificados pela função biológica, com os respectivos símbolos, função biológica depositada no Gene Ontology (GOBiol), razão, erro padrão da média (EPM) e probabilidade

(continua)

Identificação	Nome do Gene	Símbolo	GOBiol	Razão	EPM	Prob. Valor P
AJ620949.1	sialytransferase 7	SIAT7F	carbohydrate metabolism	2,06	0,41	0,02
CK770730	glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	carbohydrate metabolism	2,17	0,50	0,04
BM031152	sialidase 1 (lysosomal sialidase)	NEU1	carbohydrate metabolism	2,33	0,40	0,01
CK979365	DiGeorge syndrome critical region gene 6-like	DGCR6L	cell adhesion	1,90	0,41	0,04
AF416586.1	interleukin 17 (cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 8)	IL17	cell death	3,42	0,46	<0,01
BF605736	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	ABL1	cell growth and or maintenance	1,65	0,33	0,04
NM_174555.1	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	cell growth and or maintenance	1,89	0,27	<0,01
CK773363	transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)	TCF3	cell growth and or maintenance	2,41	0,57	0,03
CK777233	HMT1 hnRNP methyltransferase-like 2 (S. cerevisiae)	HRMT1L2	cell surface receptor linked signal transduction	1,88	0,43	0,05
CK955647	integrin-linked kinase	ILK	cell-matrix adhesion	1,96	0,33	0,01
NM_174678.2	prophet of Pit1, paired-like homeodomain transcription factor	PROP1	central nervous system development	1,86	0,40	0,03
CK836846	LIM domain binding 1	LDB1	development	1,47	0,26	0,04
CK770255	HemK methyltransferase family member 1	HEMK1	DNA methylation	2,88	0,48	<0,01
NM_174305.1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	CYP19A1	electron transport	2,05	0,44	0,03
NM_174151.1	proopiomelanocortin (adrenocorticotropin/ beta-lipotropin/ alpha-melanocyte stimulating hormone/ beta-melanocyte stimulating hormone/ beta-endorphin)	POMC	energy pathways	1,66	0,31	0,03
CK976966	dihydrolipoamide dehydrogenase	DLD	energy pathways	2,19	0,33	<0,01
AJ491865.1	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C	HTR2C	feeding behavior	2,22	0,47	0,02
NM_174134.2	oxytocin receptor	OXTR	G-protein signaling, coupled to IP3 second messenger (phospholipase C activating)	1,45	0,22	0,02
CK770847	heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	heme oxidation	1,68	0,28	0,02

Tabela 14 - Relação dos genes cujas expressões foram elevadas com a aplicação de leptina, classificados pela função biológica, com os respectivos símbolos, função biológica depositada no Gene Ontology (GOBiol), razão, erro padrão da média (EPM) e probabilidade.

(Continuação)

Identificação	Nome do Gene	Símbolo	GOBiol	Razão	EPM	Prob. Valor P
NM_205813.1	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	PAICS	IMP biosynthesis	1,88	0,37	0,02
M20638.1	phospholipase C, delta 1	PLCD1	intracellular signaling cascade	1,81	0,30	0,01
NM_177523.2	suppressor of cytokine signaling 2	SOCS-2	JAK-STAT cascade	1,43	0,20	0,01
CK769752	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	STAT-3	JAK-STAT cascade	2,14	0,47	0,03
CK777442	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	ME3	malate metabolism	2,08	0,49	0,04
CK772843	pyrophosphatase (inorganic)	PP	metabolism	1,40	0,23	0,05
NM_175790.2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	IDH2	metabolism	1,94	0,28	<0,01
CK944548	nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	mitotic anaphase	1,64	0,26	0,01
CB426012	paired-like homeodomain transcription factor 1	PITX1	morphogenesis	1,89	0,44	0,05
CB417463	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)	MEF2C	muscle development	2,10	0,32	<0,01
BM364844	zinc finger protein 174	ZNF174	negative regulation of transcription from Pol II promoter	1,48	0,20	0,01
NM_178572.2	carbonic anhydrase II	CA2	one-carbon compound metabolism	1,85	0,28	<0,01
CK954300	mitogen-activated protein kinase kinase 2	MAP2K2	protein amino acid phosphorylation	1,92	0,44	0,04
CK848313	eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	protein biosynthesis	1,91	0,30	0,01
BM967716	aspartyl-tRNA synthetase	DARS	protein biosynthesis	2,44	0,43	0,01
NM_183082.1	aryl hydrocarbon receptor interacting protein	AIP	protein folding	2,30	0,37	<0,01
NM_174750.2	carboxypeptidase A1 (pancreatic)	CPA1	proteolysis and peptidolysis	1,56	0,29	0,04
CB427718	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding	E2F4	regulation of cell cycle	1,86	0,36	0,02
CK845993	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein	DBP	regulation of transcription from Pol II promoter	1,87	0,33	0,01
CK972355	retinoid X receptor, beta	RXRβ	regulation of transcription, DNA-dependent	1,62	0,27	0,02
CK770597	Jumonji, AT rich interactive domain 1A (RBBP2-like)	JARID1A	regulation of transcription, DNA-dependent	1,76	0,30	0,01

Tabela 14 - Relação dos genes cujas expressões foram elevadas com a aplicação de leptina, classificados pela função biológica, com os respectivos símbolos, função biológica depositada no Gene Ontology (GOBiol), razão, erro padrão da média (EPM) e probabilidade.

(Conclusão)						
Identificação	Nome do Gene	Símbolo	GOBiol	Razão	EPM	Prob. Valor P
CL7310 Contigl	iroquois homeobox protein 3	IRX3	regulation of transcription, DNA-dependent	1,81	0,35	0,02
CK958263	transcription factor EB	TFEB	regulation of transcription, DNA-dependent	2,25	0,56	0,05
CK955028	SMART/HDAC1 associated repressor protein 'sphen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	SHARP/ SPEN	regulation of transcription, DNA-dependent	2,86	0,33	<0,01
AY078127.1	aryl hydrocarbon receptor	AHR	response to stress	1,41	0,22	0,03
CB432997	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	MAP4K4	response to stress	2,08	0,37	0,01
CK945688	general transcription factor IIF, polypeptide 2, 30kDa	GTF2F2	RNA elongation from Pol II promoter	1,83	0,35	0,02
BI539663	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54	DDX54	RNA processing	1,66	0,35	0,05
CK951135	FtsJ homolog 2 (E. coli)	FTSJ2	rRNA processing	2,14	0,52	0,04
BI538548	low density lipoprotein-related protein 12	LRP12	signal transduction	1,40	0,22	0,04
CK974616	casein kinase 1, gamma 2	CSNK1G2	signal transduction	1,61	0,30	0,03
NM_174554.1	insulin-like growth factor binding protein 1	IGFBP1	signal transduction	1,78	0,38	0,04
AB035802.1	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6 'Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	TNFSF6/ FASLG	signal transduction	1,80	0,29	0,01
NM_174339.2	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF1A	signal transduction	1,96	0,46	0,04
NM_173986.2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT1	signal transduction	2,35	0,52	0,03
NM_174647.2	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein, DARPP-32)	PPP1R1B	signal transduction	5,00	0,41	<0,01
CK968996	sorbitol dehydrogenase	SORD	sorbitol metabolism	2,25	0,47	0,02
CB439197	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	SLC29A1	transport	1,62	0,28	0,02
CB446780	KIAA1443	KIAA1443		1,77	0,27	0,01
BM254199	asparagine-linked glycosylation 12 homolog (yeast, alpha-1,6-mannosyltransferase)	ALG12		1,84	0,40	0,04
BM890616	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	PDXK		2,06	0,46	0,03
NM_174225.1	actin, alpha 1, skeletal muscle	ACTA1		2,38	0,40	<0,01
BE681647	high mobility group AT-hook 1	HMG1		3,56	0,53	<0,01

Dentro os genes diferencialmente expressos com a aplicação da leptina, alguns se destacam pela conexão com a regulação da puberdade ou sinalização da leptina.

Foram expressas no hipotálamo de novilhas tratadas com leptina, proteínas envolvidas na regulação da sinalização da leptina. A proteína SRC é parte da família das tirosinas quinase. O gene SRC possui um homólogo 2 (SH2), envolvido com a ligação das proteínas, que contêm domínios SH2, ao receptor ativado, e/ou fosforilação das proteínas para o início do sinal de transdução (LI; FRIEDMAN, 1999). O domínio SH2 contendo proteína tirosina fosfatase 2 (SHP-2), a fosfotirosina fosfatase, foi isolado e encontrado ligado a tirosina 985 do receptor da leptina (*Ob-Rb*) (FREEMAN et al., 1992; AHMAD et al., 1993; FENG et al., 1993; VOGEL et al., 1993). A ligação da SHP-2 ao *Ob-Rb* pode levar à ativação da atividade da fosfatase (LI; FRIEDMAN, 1999), exercendo função como reguladora negativa da sinalização da leptina (CARPENTER et al., 1998). Os resultados obtidos no presente trabalho revelam que o gene SRC foi menos expresso (1,64 vezes; $P = 0,04$) em novilhas tratadas com leptina (Tabela 14), o que sugere menor ação inibitória por esta proteína.

Li e Friedman, 1999 sugerem que a desfosforilação de JAK2 é uma ação importante da SHP-2 e a inibição de sua atividade pode aumentar a ação da leptina. Outras proteínas, como as proteínas SOCS, também podem agir no sentido de modular transdução de sinal da leptina (BJØRBAEK et al., 1998).

A proteína SOCS-2 foi 1,43 vezes ($P = 0,01$) mais expressa no hipotálamo de novilhas tratadas com leptina (Tabela 14), sua ação ainda não é bem compreendida, porém sabe-se que ao contrário de SOCS-1 e SOCS-3, CIS e SOCS-2 não se ligam, ou inibem, as *janus kinases* (JAKs) (PEZET et al., 1999; YASUKAWA et al., 1999).

Uma das principais vias de ação da leptina através da ligação hipotalâmica com seu receptor, *Ob-Rb*, é a ativação do STAT-3 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) e conseqüente translocação para o núcleo para mediar a regulação da transcrição de genes resposta, como CIS, SOCS-1 e SOCS-3 (KREBS et al., 2001; MEYERS et al., 2008). Em nosso estudo, o STAT-3 foi 2,14 vezes ($P = 0,03$) mais expresso em novilhas tratadas com leptina (Tabela 14), porém parece não haver estimulado a expressão de SOCS-3, como demonstrado no estudo da expressão gênica por PCR em tempo real.

Existem seis proteínas moduladoras da atividade do IGF-1, as proteínas de ligação do IGF (IGFPBs). Elas são formadas por pequenos peptídeos e possuem alta afinidade com IGF-1 e IGF-2 (MONGET et al., 2002). Sabe-se que as IGFPBs 1 e 2 são negativamente afetadas pelo hormônio do crescimento, e que IGFPB-3 é positivamente regulada pelo mesmo hormônio.

Em experimentos com bovinos de corte, a restrição crônica de energia da dieta diminuiu as concentrações séricas de IGF-1, e a concentração de IGF-1 aumentou em associação com o início da função reprodutiva (ELSASSER et al., 1989; RUTTER et al., 1989; NUGENT III et al., 1993). O IGF-1 e/ou suas proteínas de ligação mediam a liberação de GnRH e LH, exercendo ações endócrina, parácrina ou autócrina no hipotálamo e na glândula pituitária. Alterações no padrão de secreção de FSH e LH durante o ciclo estral provocam alterações na concentração intrafolicular de inibina, ativina e IGFPB-2 que resultam em seleção, dominância folicular e perda de dominância do folículo dominante (ROCHE, 1996). As IGFPBs inibem esteroidogênese nas células da teca interna e da granulosa, contribuindo com a regulação na atividade cíclica ovariana (WETTEMAN; BOSSIS, 2000).

No atual estudo, as IGFPB-1 e 2, foram mais expressas no hipotálamo de novilhas tratadas com leptina que em novilhas não tratadas, sendo IGFPB-1 1,78 vezes ($P = 0,04$) mais expressa e IGFPB-2 1,89 vezes ($P = 0,05$) (Tabela 14). As IGFPBs podem desempenhar função de potencialização (WEBB et al., 1992; SNYDER et al., 1999; FERREIRA et al., 2002) da ação do IGF-1, ou exercer ação inibitória (SNYDER et al., 1999; FERREIRA et al., 2002), dependendo dos seus níveis celulares, de mudanças pós-transducionais na fosforilação e degradação proteolítica e nos ligantes da matriz extracelular (FERREIRA et al., 2002). Por participarem da mesma via mediadora da função das gonadotrofinas e exercerem ação direta sobre a dominância de folículos, o mecanismo de regulação por parte da leptina na função reprodutiva pode ser estudado com o auxílio das proteínas de ligação IGF.

Estes resultados de expressão diferencial de genes hipotalâmicos devido à aplicação de leptina podem ajudar na elucidação de seu mecanismo sinalizador, porém, como a infusão de leptina não acelerou o início da puberdade, é necessário cautela ao extrapolar estes resultados para o mecanismo regulador da puberdade em novilhas.

6 CONCLUSÕES

Tanto o consumo de energia quanto a aplicação com leptina influenciaram o padrão de expressão gênica no hipotálamo de novilhas Nelore. Não houve efeito de dieta, ou da infusão de leptina, sobre a expressão dos genes NPY e seu receptor NPY-Y4.

O maior consumo de energia reduziu em 4,4 vezes a expressão do NPY-Y1. Este resultado sugere que o maior consumo de energia, ao reduzir a expressão do gene do NPY-Y1, tornaria o hipotálamo menos sensível à ação do NPY, possibilitando a entrada precoce em puberdade. A infusão com leptina reduziu em 2,9 vezes a expressão do gene SOCS-3.

A análise por microarranjos de DNA identificou genes diferencialmente expressos que podem estar envolvidos na modulação pela nutrição sobre o início da puberdade. Dentre estes genes se destacam a β -arrestina 1 que foi 1,40 vezes mais expresso em novilhas submetidas à dieta de alta energia, e as proteínas de ligação do IGF, IGFPB-1 e 2, que foram mais expressas no hipotálamo de novilhas tratadas com leptina que em novilhas não tratadas.

Estes resultados, em conjunto com resultados anteriores obtidos por nosso laboratório, indicam que a modulação da quantidade do receptor do NPY, NPY-Y1, no hipotálamo possa ser uma via importante pela qual a nutrição afeta o início da puberdade em novilhas. Indicam ainda que a leptina possa alterar a via de sinalização do IGF-I no hipotálamo através da modulação da expressão de suas proteínas ligadoras.

REFERÊNCIAS

ADAM, C. L.; ARCHER, Z. A.; FINDLAY, P. A.; THOMAS, L.; MARIE, M. Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine- and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. **Neuroendocrinology**, v. 75, p. 250-256, 2002.

AHIMA, R. S.; PRABAKARAN, D.; MANTZOROS, C.; QU, D. Q.; LOWELL, B.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J. S. 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. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p.391–395, 1997.

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Leptin. **Annual Review of Physiology**, v. 62, p. 413–437, 2000.

AHMAD, S.; BANVILLE, D.; ZHAO, Z.; FISCHER, E. H.; SHEN, S. H. A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 90, p. 2197–2201, 1993

ALEXANDER, W. S. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. **Nature Review of Immunology**, v. 2, p. 410–416, 2002.

ALLEN, Y. S.; ADRIAN, T. E.; ALLEN, J. M.; TATEMOTO, K.; CROW, T. J.; BLOOM, S. R.; POLAK, J. M. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. **Science**, v. 221, p. 877–879, 1983.

ARORA, S. A. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – A review. **Neuropeptides Journal**, v. 40, 6. ed., p. 375-401, 2006.

AUBERT, M. L.; PIERROZ, D. D.; GRUAZ, N. M.; D'ALLEVES, V.; VUAGNAT, B. A.; PRALONG, F. P.; BLUM, W. F.; SIZONENKO, P. C. Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropeptide Y and leptin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, p. 107-113, 1998.

BANKS, W. A. The many lives of leptin. **Peptides**, v. 25, p. 331–338, 2004.

BAO, L.; KOPP, J.; ZHANG, X.; XU, Z. Q.; ZHANG, L. F.; WONG, H.; WALSH, J.; HÖKFELT, T. Localization of neuropeptide Y Y1 receptors in cerebral blood vessels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 94, p. 12661–12666, 1997.

BARB, C. R. The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1249–1257, 1999.

BARB, C. R.; BARRETT, J. B.; KRAELING, R. R.; RAMPACEK, G. B. Serum leptin concentrations, luteinizing hormone and growth hormone secretion during feed and metabolic fuel restriction in the prepuberal gilt. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 20, p. 47–63, 2001.

BARB, C. R.; KRAELING, R. R.; RAMPACEK, G. B.; DOVE, C. R. Metabolic changes during the transition from the fed to the acute feed-deprived state in prepuberal and mature gilts. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 781–789, 1997.

BASKIN, D. G.; BREININGER, J. F.; SHWARTZ, M. W. SOCS-3 expression in leptin-sensitive neurons of the hypothalamus of fed and fasted rats. **Regulatory Peptides**, v. 92, p. 9-15, 2000.

BERGLUND, M. M.; SCHOBER, D. A.; STATNICK, M. A.; McDONALD, P. H.; GEHLERT, D. R. The use of bioluminescence resonance energy transfer 2 to study neuropeptide Y receptor agonist-induced beta-arrestin 2 interaction. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 147–156, 2003.

BERGONZELLI, G. E.; PRALONG, F. P.; GLAUSER, M.; CAVADAS, C.; GROUZMANN, E.; GAILLARD, R. C. Interplay between galanin and leptin in the hypothalamic control of feeding via corticotropin-releasing hormone and neuropeptide Y. **Diabetes**, v. 50, p. 2666–2672, 2001.

BESECKE, L. M.; WOLFE, A. M.; PIERCE, M. E.; TAKAHASHI, J. S.; LEVINE, J. E. Neuropeptide Y stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from superfused hypothalamic GT1-7 cells. **Endocrinology**, v. 135, p. 1621–1627, 1994.

BJØRBAEK, C.; UOTANI, S.; DA SILVA, B.; FLIER, J.S. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 32686–32695, 1997.

BJØRBAEK, C.; ELMQUIST, J. K.; FRANTZ, J. D.; SHOELSON, S. E.; FLIER, J. S. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. **Molecular Cell**, v. 1, p. 619–625, 1998.

BJØRBAEK, C.; KAHN, B.B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 59, p. 305–331, 2004.

BJØRBAEK, C.; LAVERY, H. J.; BATES, S. H.; OLSON, R. K.; DAVIS, S. M.; FLIER, J. S.; MYERS JR, M. G. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. **Journal of Biological Chemistry**. v. 275, p. 40649–40657, 2000.

BLOMQUIST, A. G.; HERZOG, H. Y-receptor subtypes—how many more? **Trends Neurosci**, v. 20, p. 294–298, 1997.

BOSSIS, I.; WETTEMANN, R.P; WELTY, S.D., *et al.* Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. **Journal of animal Science**, v.77, n.6, p.1536-1546, 1999.

BOSSIS, I.; WETTEMANN, R.P; WELTY, S.D., *et al.* Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. **Biology of Reproduction**, v.62, n.5, p.1436-1444, 2000.

BRADY, L. S.; SMITH, M. A.; GOLD, P. W.; HERKENHAM, M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food- restricted and food-deprived rats. **Neuroendocrinology**, v. 52, p. 441–447, 1990.

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. **Endocrinology**, v. 118, p. 2483–2487, 1986.

BRONSON, F. H. Puberty in female rats: relative effect of exercise and food restriction. **American Journal of Physiology**, v. 252, p. 140-144, 1987.

BROQUA, P.; WETTSTEIN, J. G. ROCHER, M. N. GAUTHIER-MARTIN, B. JUNIEN, J. L. Behavioral effects of neuropeptide Y receptor agonists in the elevated plus-maze and fear-potentiated startle procedures. **Behaviour Pharmacology**, v. 6, p. 215–222, 1995.

BUTLER, W. R.; MALVEN, P. V.; WILLE, L. B.; BOLT, D. J. Patterns of pituitary release and cranial out-put of LH and prolactin in ovariectomized ewes. **Endocrinology**, v. 91, p. 793-801, 1972.

CABRELE, C.; BECK-SICKINGER, A. G. Molecular characterization of the ligandreceptor interaction of the neuropeptide Y family. **Journal of Peptide Science**, v. 6, p. 97–122, 2000.

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.

CARPENTER, L.R. et al. Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 95, p. 6061–6066, 1998.

CARVALHO, M.V. **Efeito do fornecimento crônico de leptina e da nutrição na maturação sexual de novilhas zebuínas (*bos taurus indicus*)**. 2009. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CATALANO, R.; SIRHAN, I. Nutrición y anestro posparto em vacas de carne. **Avances em Producción Animal**, v. 20, n. 1-2, p. 1-16, 1995.

CHEHAB, F. F.; MOUNZIH, K.; LU, R.; LIM, M. E. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. **Science**, v. 274, p. 88-89, 1997.

CHENG, A.; UETANI, N.; SIMONCIC, P. D.; CHAUBEY, V. P.; LEE-LOY, A.; MCGLADE, C. J.; KENNEDY, B. P.; TREMBLAY, M. L. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. **Developmental Cell**, v. 2, p. 497-503, 2002.

CHENG, X.; BROBERGER, C.; TONG, Y.; YONGTAO, X.; JU, G.; ZHANG, X.; HOKFELT, T. Regulation of expression of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors in the arcuate nucleus of fasted rats. **Brain Research**, v. 792, p. 89-96, 1998.

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. **Endocrinology**, v. 138, p. 855–858, 1997.

CHEUNG, C. C.; THORNTON, J. E.; NURANI, S. D.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. **Neuroendocrinology**, v. 74 p. 12–21, 2001.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal of Biochemistry**, v. 162, p. 156–159, 1987.

CIOFI, P.; TRAMU, G.; BLOCH, B. Comparative immunohistochemical study of the distribution of neuropeptide Y, growth hormonereleasing factor and the carboxyterminus of precursor protein GHRF in the human hypothalamic infundibular area. **Neuroendocrinology**, v. 51, p. 429–436, 1990.

CLEVELAND, W. S.; GROSSE, E. Computational methods for local regression. **Statistics and Computing**, v. 1, p. 47-62, 1991.

CONSIDINE, R. V.; SINHA, M. K.; HEIMAN, M. L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T. W.; NYCE, M. R.; OHANNESIAN, J. P.; MARCO, C. C.; MCKEE, L. J.; BAUER, T. L.; CARO, J. F. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normalweightand obese humans. **New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 292–295, 1996.

CUI, X.; CHURCHILL, G. A. **How many mice and how many arrays?** Replication in mouse cDNA microarray experiments. 2003. Disponível em: <<http://www.jax.org/research/churchill>>. Acesso em: 02 mar. 2010.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 341.

CUNNINGHAM, M. J.; CLIFON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 216-222, 1999.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; ZALESKY, D. D.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Effects of dietary energy intake during the prepubertal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing-hormone releasing hormone in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 1641-1648, 1986

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

DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F., *et al.* Effects of nutritional and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3-4, p.345-370, 2003.

DUMONT Y.; MARTEL, J. C.; FOURNIER, A.; ST-PIERRE, S.; QUIRION, R. Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. **Progress in Neurobiology**, v. 38, p. 125-167, 1992.

DYER, D. J.; SIMMONS, J. M.; MATTERY, R. L.; KEISLER, D. H. Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p. 119-128, 1997.

EL MAJDOUBI, M.; SAHU, A.; RAMASWAMY, S.; PLANT, T. M. Neuropeptide Y: A hypothalamic brake restraining the onset of puberty in primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 97, p. 6179-6184, 2000.

ELCHEBLY, M.; PAYETTE, P.; MICHALISZYN, E.; CROMLISH, V.; COLLINS, S.; LEE-LOY, A.; NORMANDIN, D.; CHENG, A.; HIMMS-HAGEN, J. CHAN, C.; RAMACHANDRAN, C.; GRESSER, M. J.; TREMBLAY, M. L.; KENNEDY, B. P. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science**, v. 283, p. 1544-1548, 1999.

ELMQUIST, J. K.; MARATOS-FLIER, E.; SAPER, C. B.; FLIER J. S. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. **Nature Neuroscience**, v. 1, n. 6, p. 445-450, 1998.

ELSASSER, T. H.; RUMSEY, T. S.; HAMMOND, A.C. Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-1 in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 128–141, 1989.

ENDO, T. A.; MASUHARA, M.; YOKOUCHI, M.; SUZUKI, R.; SAKAMOTO, H.; MITSUI, K.; MATSUMOTO, A.; TANIMURA, S.; OHTSUBO, M.; MISAWA, H.; MIYAZAKI, T.; LEONOR, N.; TANIGUCHI, T.; FUJITA, T.; KANAKURA, Y.; KOMIYA, S.; YOSHIMURA, A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. **Nature**, v. 387, p. 921–924, 1997.

ENRIORI, P. J.; EVANS, A. E.; SINNAYAH, P.; COWLEY, M. A. Leptin resistance and obesity. **Obesity**, v. 14, p. 254S–258S, 2006. Supplement, 5.

ESTIENNE, M.J.; SCHILLO, K.K.; HILEMAN, S.M.; GREEN, M.A.; HAYES, S.H.; BOLING, J.A. Effects of free fatty acids on luteinizing hormone and growth hormone secretion in ovariectomized lambs. **Endocrinology**, v. 126, p. 1934–1940, 1990.

EVA, C.; KEINANEN, K.; MONYER, H.; SEEBURG, P.; SPRENGEL, R. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family, **FEBS Letter**, v. 271, p. 81–84, 1990.

EVA, C.; OBERTO, A.; SPRENGEL, R.; GENAZZANI, E. The murine NPY-1 receptor gene. Structure and delineation of tissue-specific expression, **FEBS Letter**, v. 314, p. 285–288, 1992.

EVA, C.; SERRA, M.; MELE, P.; PANZICA, G.; OBERTO, A.; Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 27, p. 308–339, 2006.

EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 187-194, 1994.

EVANS, W. S.; WELTMAN, J. Y.; JOHNSON, A.; WELTMAN, J. D.; ROGOL, A. D. Effect of opioid receptor blockade on luteinizing hormone (LH) pulses and interpulse LH concentrations in normal women during the early phase of menstrual cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 15, p. 525-531, 1992.

EYCKERMAN, S.; BROEKAERT, D.; VERHEE, A.; VANDEKERCKHOVE, J.; TAVERNIER, J. Identification of the Y985 and Y1077 motifs as SOCS3 recruitment sites in the murine leptin receptor. **FEBS Letter**, v. 486, p. 33-37, 2000.

FENG, G. S.; HUI, C. C.; PAWSON, T. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. **Science**, v. 259, p. 1607–1611, 1993.

FERREIRA, J.L.; TONIOLLI, R.; DUARTE, A.B.C. *et al.* Ação do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1) e de suas proteínas ligadoras (IGFBPs) no desenvolvimento folicular de bovinos – Revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.4, p.306-311, 2002.

FONG, T. M.; HUANG, R. R.; TOTA, M. R.; MAO, C.; SMITH, T.; VARNERIN, J.; KARPITSKIY, V. V.; KRAUSE, J. E.; VAN DER PLOEG, L. H. Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 53, p. 234–240, 1998.

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. **Endocrinology**, v. 116, p. 375–381, 1985.

FOSTER, D. L.; RYAN, K. D. Endocrine mechanisms governing transition into adulthood: a marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in the lamb during puberty. **Endocrinology**, v. 105, p. 896-904, 1979.

FREEMAN, R. M. J.; PLUTZKY, J.; NEEL, B. G. Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 89, p. 11239–11243, 1992

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

FRIES, L. A.; BRITO, F. V.; ALBUQUERQUE, L. G. Possíveis conseqüências de seleção para incrementar pesos às idades-padrão vs. reduzir idades para produzir unidades de mercado. In: **33ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 33., 1996. Fortaleza. **Anais...** Fortaleza-CE: SBZ, 1996. p. 310-312.

FRISCH, R. E.; REVELLE, R.; COOK, S. Components of weight at menarche and the initiation of the adolescent growth spurt in girls: Estimated total water, lean body weight and fat. **Human Biology**, v. 45, p. 469–483. 1973.

FRISCH, R. E.; WYSHAK, G.; VINCENT L. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. **New England Journal of Medicine**, v. 303, n.1, p. 17-19, 1980.

FUNAHASHI, H.; TAKENOYA, F.; GUAN, J. L.; KAGEYAMA, H.; YADA, T.; SHIODA S. Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. **Anatomical Science International**, v. 78, p. 123–138, 2003.

GARCIA, M. R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S. W.; STANKO, R. L.; MORRINSON, 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. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2158–2167, 2002.

GEHLERT, D. R. Multiple receptors for the pancreatic polypeptide (PP-fold) family: physiological implications. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 218, p. 7–22, 1998.

GERALD, C.; WALKER, M. W.; CRISCIONE, L.; GUSTAFSON, E. L.; BATZL-HARTMANN, C.; SMITH, K. E.; VAYSSE, P.; DURKIN, M. M.; LAZ, T. M.; LINEMEYER, D. L.; SCHAFFHAUSER, A. O.; WHITEBREAD, S.; HOFBAUER, K. G.; TABER, R. I.; BRANCHEK, T. A.; WEINSHANK, R. L. A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. **Nature**, v. 382, p. 168–171, 1996.

GOBBI, M.; GARIBOLDI, M.; PIWKO, C.; HOYER, D.; SPERK, G.; VEZZANI, A. Distinct changes in peptide YY binding to, and mRNA levels of, Y1 and Y2 receptors in the rat hippocampus associated with kindling epileptogenesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, p. 1615–1622, 1998.

GRUAZ, N. M.; LALAOUI, M.; PIERROZ, D. D.; ENGLARO, P.; SIZONENKO, P. C.; BLUM, W. F.; AUBERT, M. L. Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 10, p. 627–633, 1998.

GRUAZ, N. M.; PIERROZ, D. D.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; SIZONENKO, P. C.; AUBERT, M. L. Evidence that neuropeptide Y could represent a neuroendocrine inhibitor of sexual maturation in unfavorable metabolic conditions in the rat. **Endocrinology**, v. 133, p. 1891–1894, 1993.

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

HAMILTON, G. D.; BRONSON, F. H. Food restriction and reproductive development: male and female mice and male rats. **American Journal of Physiology**, v. 250, p. R370–R376, 1986.

HANIU, M.; ARAKAWA, T.; BURES, E. J.; YOUNG, Y.; HUI, J. O.; ROHDE, M. F.; WELCHER, A. A.; HORAN, T. Human leptin receptor. Determination of disulfide structure and N-glycosylation sites of the extracellular domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 28691–28699, 1998.

HEILIG, M. Antisense inhibition of neuropeptide Y (NPY)-Y1 receptor expression blocks the anxiolytic-like action of NPY in amygdala and paradoxically increases feeding. **Regulatory Peptides**, v. 59, p. 201–205, 1995.

HENRY, B.A. Links between the appetite regulating systems and the neuroendocrine hypothalamus: lessons from the sheep. **Journal of Neuroendocrinology**, v.15, n.7, p.697-709, 2003.

HENRY, B.A., TILBROOK, A.J.; DUNSHEA, F.R., *et al.* Long-term alterations in adiposity affect the expression of melanin-concentrating hormone and enkephalin but not proopiomelanocortin in the hypothalamus of ovariectomized ewes. **Endocrinology**, v.141, n.4, p.1506-1514, 2000.

HERZOG, H.; HORT, Y. J.; BALL, H. J.; HAYES, G.; SHINE, J.; SELBIE, L. A. Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 89, p.5794–5798, 1992.

HESS, B. W.; LAKE, S. L.; SCHOLLJEGERDES, E. J.; *et al.* Nutritional controls of beef cow reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 13, p. 90-106, 2005. Supplement, 1.

HILEMAN, S. M.; PIERROZ, D. D.; MASUZAKI, H.; BJØRBAEK, C.; EL-HASCHIMI, K.; BANKS, W. A.; FLIER, J. S. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. **Endocrinology**, v. 143, p. 775–783, 2002.

HILTON, D. J. Negative regulators of cytokine signal transduction. **Cell and Molecular Life Science**, v. 55, p. 1568-1577, 1999.

HINEY, J.K.; OJEDA, S.R.; DEES, W.L. Insulin-like growth factor-1: a possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. **Endocrinology**, v.54, n.4, p.420-423, 1991.

HOLLIDAY, N. D.; LAM, C. W.; TOUGH, I. R.; COX, H. M. Role of the C terminus in neuropeptide Y Y1 receptor desensitization and internalization. **Molecular Pharmacology**, v. 67, p. 655–664, 2005.

HONARAMOOZ, A.; CHANDOLIA, R. K.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Effects of season of birth on the prepubertal pattern of gonadotropin secretion and age at puberty in beef heifers. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, p. 67-79, 1999.

HOUSEKNECHT, K. L., PORTOCARRERO, C. P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 457–475, 1998.

HOUSEKNECHT, K. L.; BOGGS, D. L.; CAMPION, D. R.; SARTIN, J. L.; KISER, T. E.; RAMPACEK, G. B.; AMOS, H. E. Effect of dietary energy source and level on serum growth hormone, insulin-like growth factor-I, growth and body composition in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 2916–2923, 1988.

HOUSEKNECHT, K. L.; BAILE, C. A.; MATTERI, R. L. *et al.* The biology of leptin: a review. **Journal of Animal Science**. v.76, n.5, p.1405-1420, 1998.

HOWARD, J. K.; CAVE, B. J.; OKSANEN, L. J.; TZAMELI, I.; BJØRBAEK, C.; FLIER, J. S. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of *Socs3*. **Nature Medicine**. v. 10, n. 7, p. 734-738, 2004

HUANG, L., WANG, Z., LI, C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 6343–6349, 2001.

ICHIMARU, T.; MORI, Y.; OKAMURA, H. A possible role of neuropeptide Y as a mediator of undernutrition to the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator in goats. **Endocrinology**, v.142, n.6, p.2489–2498, 2001.

IRIE-SASAKI, J.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, W.; OPAVSKY, A.; CHENG, M.; WELSTEAD, G.; GRIFFITHS, E.; KRAWCZYK, C.; RICHARDSON, C. D.; AITKEN, K.; ISCOVE, N.; KORETZKY, G.; JOHNSON, P.; LIU, P.; ROTHSTEIN, D. M.; PENNINGER, J. M. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. **Nature**, v. 409, p. 349-354, 2001.

KALRA, S. P.; DUBE, M. G.; SAHU, A.; PHELPS, C. P.; KALRA, P. S. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 88, p. 10931–10935, 1991.

KALRA, S.P.; FUENTES, M.; FOURNIER, A.; PARKER, S.L.; CROWLEY, W.R. Involvement of the Y-1 receptor subtype in the regulation of luteinizing hormone secretion by neuropeptide Y in rats. **Endocrinology**, v. 130, p. 3323–3330, 1992.

KASK, A.; RAGO, L. HARRO, J. Evidence for involvement of neuropeptide Y receptors in the regulation of food intake: studies with Y1-selective antagonist BIBP3226. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 1507–1515, 1998.

KEISLER D.H.; LUCY, M.C. Perception and interpretation of the effects of undernutrition on reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1–17, 1996.

KENNEDY, G.C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Proceedings of the Royal Society**, v. 140, p. 578–592, 1953.

KENNEDY, G. C.; MITRA J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. **Journal of Physiology**, v. 166, p. 408–418, 1963.

KERR, M. K.; CHURCHILL, G. A. Analysis of variance for gene expression microarray data. **Journal of Computational Biology**. v. 7, p. 819-837, 2000.

KERR, M. K.; CHURCHILL, A. G. Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. **Genetical Research**. v. 77, p. 123-128, 2001.

KIESS, W.; REICH, A.; MEYER, K.; GLASOW, A.; DEUTSCHER, J.; KLAMMT, J.; YANG, Y.; MULLER, G.; KRATZSCH J. A role for leptin in sexual maturation and puberty. **Hormone Research**, v. 51, p. 55–63, 1999.

KINDER, J. E.; BERGFELD, E. G.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; KOJIMA, F. N. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 393-407, 1995. Supplement.

KISHI, T.; ASCHKENASI, C. J.; CHOI, B. J.; LOPEZ, M. E.; LEE, C. E.; LIU, H.; HOLLENBERG, A. N.; FRIEDMAN, J. M.; ELMQUIST, J. K. Neuropeptide Y Y1 receptor mRNA in rodent brain: distribution and colocalization with melanocortin-4 receptor. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 482, p. 217–243, 2005.

KOLACZYNSKI, J. W.; CONSIDINE, R. V.; OHANNESIAN, J.; MARCO, C.; OPENTANOVA, I.; NYCE, M. R.; MYINT, M.; CARO, J. F. Responses to leptin in short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. **Diabetes**, v. 45, p. 1511–1515, 1996.

KRAUSE, J.; EVA, C.; SEEBURG, P. H.; SPRENGEL, R. Neuropeptide Y1 subtype pharmacology of a recombinantly expressed neuropeptide receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 41, p. 817–821, 1992.

KREBS, D. L.; HILTON, D. J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. **Stem Cells**, v. 19, p. 378–387, 2001.

LEE, M. L.; LU, W.; KUO, F. C.; WHITMORE, G. A.; SKLAR, J. Importance of replication in microarray gene expression studies: Statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, p. 9834-9839, 2000.

LESNIAK, M.A.; HILL, J.M.; KIESS, W. et al Receptors for insulin-like growth factors I and II: autoradiographic localization in rat brain comparison to receptors for insulin. **Endocrinology**, v.123, n.4,p.2089-2099, 1988.

LI, C.; FRIEDMAN, J. M. Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 96, p. 9677–9682, 1999.

LIN, J.; BARB, C. R.; MATTERI, R. L.; KRAELING, R. R.; CHEN, X.; MEINERSMANN, R. J.; RAMPACEK, G. B. Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 19, p. 53–61, 2000.

LOLLMANN, B.; GRUNINGER, S.; STRICKER-KRONGRAD, A.; CHIESI, M. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 238, p. 648–652, 1997.

LUNDELL, I.; BLOMQUIST, A. G.; BERGLUND, M. M.; SCHOBER, D. A.; JOHNSON, D.; STATNICK, M. A.; GADSKI, R. A.; GEHLERT, D. R.; LARHAMMAR, D. Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 29123–29128, 1995.

MACKEY, D. R.; SREENAN, J. M.; ROCHE, J. F., et al. The effect of acute nutritional restriction on incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentrations in beef heifers. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1601-1607, 1999.

MADSEN, S. A.; CHANG, L.; HICKEY, M.; ROSA, G. J. M.; COUSSENS, P. M.; BURTON J. L. Microarray analysis of gene expression in blood neutrophils of parturient cows. **Physiological Genomics**, v. 16, p. 212-221, 2004.

MANNON, P. J.; MELE, J. M. Peptide YY Y1 receptor activates mitogenactivated protein kinase and proliferation in gut epithelial cells via the epidermal growth factor receptor. **Biochemical Journal**, v. 350, p. 655–661, 2000.

MASUHARA, M.; SAKAMOTO, H.; MATSUMOTO, A.; SUZUKI, R.; YASUKAWA, H.; MITSUIA, K.; WAKIOKAB, T.; TANIMURA, S.; SASAKI, A.; MISAWA, H.; YOKOUCHIB, M.; OHTSUBOA, M.; YOSHIMURA, A. Cloning and characterization of novel CIS family genes. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 239, p. 439-446, 1997.

MCDONALD, P. H.; LEFKOWITZ, R. J. Beta arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors function. **Cellular Signalling**, v. 13, p. 683–689, 2001.

MCMILLEN, I. C.; EDWARDS, L. J.; DUFFIELD, J.; MUHLHAUSLER, B. S. Regulation of leptin synthesis and secretion before birth: implications for the early programming of adult obesity. **Reproduction**, v. 131, p.415–427, 2006.

MELVIN, E. J.; LINDSEY, B. R.; QUINTAL-FRANCO, J.; ZANELLA, E.; FIKE, K. E.; VAN TASSELL, C.P.; KINDER, J.E. Circulating concentrations of estradiol, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 405-412, 1999.

MICHEL, M. C.; BECK-SICKINGER, A.; COX, H.; DOODS, H. N.; HERZOG, H.; LARHAMMAR, D.; QUIRION, R.; SCHWARTZ, T.; WESTFALL, T. XVI, International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 143–150, 1998.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P. et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, n.1-2, p.139-154, 2002.

MORAN, C.; QUIRKE, J. F.; ROCHE, J. F. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 18, p.167-182, 1989.

MOUNZIH, K.; LU, R.; CHEHAB, F. F. Leptin treatment rescues sterility of genetically obese ob/ob males. **Endocrinology**, v. 138, p. 1190-1193, 1997.

MULLINS, D.; KIRBY, D.; HWA, J.; GUZZI, M.; RIVIER, J.; PARKER, E. Identification of potent and selective neuropeptide Y Y(1) receptor agonists with orexigenic activity in vivo, **Molecular Pharmacology**, v. 60, p. 534–540, 2001.

MURAKAMI, T.; YAMASHITA, T.; IIDA, M.; KUWAJIMA, M.; SHIMA, K. A short form of leptin receptor performs signal transduction. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 231, p. 26–29, 1997.

NAKA, T.; NARAZAKI, M.; HIRATA, M.; MATSUMOTO, T.; MINAMOTO, S.; AONO, A.; NISHIMOTO, N.; KAJITA, T.; TAGA, T.; YOSHIZAKI, K.; AKIRAK, S.; KISHIMOTO, T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. **Nature**, v. 387, p. 924–929, 1997.

NARAZAKI, M.; FUJIMOTO, M.; MATSUMOTO, T.; MORITA, Y.; SAITO, H.; KAJITA, T.; YOSHIZAKI, K.; NAKA, T.; KISHIMOTO, T. Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 95, p. 13130-13134, 1998.

NAVEILHAN, P.; HASSANI, H.; LUCAS, G.; BLAKEMAN, K. H.; HAO, J. X.; XU, X. J.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; THOREN, P.; ERNFORS, P. Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide Y receptor. **Nature**, v. 409, p. 513–517, 2001.

NICHOLSON, S. E.; WILLSON, T. A.; FARLEY, A.; STARR, R.; ZHANG, J.; BACA, M.; ALEXANDER, W. S.; METCALF, D.; HILTON, D. J.; NICOLA, N. A. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. **EMBO Journal**, v. 18, p. 375-385, 1999.

NIE, M.; SELBIE, L.A. Neuropeptide Y Y1 and Y2 receptor-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase activity. **Regulatory Peptide**, v. 75–76, p. 207–213, 1998.

NUGENT III, R. A.; JENKINS, T. G.; ROBERTS, A. J.; KLINDT J. Relationship of post-partum interval in mature beef cows with nutritional environment, biological type and serum IGF-I concentrations. **Animal Production**, v. 56, p. 193–200, 1993.

OGASAWARA, H.; ASO, H.; NAGAI, Y.; MATSUMOTO, K.; OKAMURA, H.; TANAKA, S.; WATANABE, K.; OHWADA, S.; YAMAGUCHI, T. Presence of neuropeptide Y in somatotrophs of cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 35, p. 274–280, 2008.

OUEDRAOGO, M.; LECAT, S.; ROCHDI, M. D.; HACHET-HAAS, M.; MATTHES, H.; GICQUIAUX, H.; VERRIER, S.; GAIRE, G.; GLASSER, N.; MÉLY, Y.; TAKEDA, K.; BOUVIER, M.; GALZI, J.; BUCHER, B. Distinct motifs of neuropeptide Y receptors differentially regulate trafficking and desensitization. **Traffic**, v. 9, p. 305–324, 2008.

PELLEYMOUNTER, M. A.; CULLEN, M. J.; BAKER, M. B.; HECHT, R.; WINTERS, D.; BOONE, T.; COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v. 269, p. 540–543, 1995.

PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Análise genética de características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37 p. 703-708, 2002.

PEREZ, C.; FERNANDEZ-GALAZ, C.; FERNANDEZ-AGULLO, T.; ARRIBAS, C.; ANDRES, A.; ROS, M.; CARRASCOSA, J. M. Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. **Diabetes**, v. 53, p. 347–353, 2004.

PEZET, A.; FAVRE, H.; KELLY, P. A.; EDERY, M. Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 24497-24502, 1999.

PIERROZ, D. D.; GRUAZ, N. M.; D'ALIEVES, V.; AUBERT, M. L. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle starting at 30 days of life delays sexual maturation in the female rat. **Neuroendocrinology**, v. 61, p. 293–300, 1995.

PLANT, T. M. Neurobiological bases underlying the control of the onset of puberty in the rhesus monkey: a representative higher primate. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 22, p. 107–139, 2001.

PORETSKY, L.; KALIN, M.F. The gonadotropic function of insulin. **Endocrine Reviews**, v.8, n.2, p.132-141, 1987.

PRALONG, F. P.; GONZALES, C.; VOIROL, M. J.; PALMITER, R. D.; BRUNNER, H. R.; GAILLARD, R. C.; SEYDOUX, J.; PEDRAZZINI, T. The neuropeptide Y Y1 receptor regulates leptin-mediated control of energy homeostasis and reproductive functions. **FASEB Journal**, v. 16, p. 712–714, 2002.

PRALONG, F. P.; VOIROL, M.; GIACOMINI, M.; GAILLARD, R. C.; GROUZMANN, E. Acceleration of pubertal development following central blockade of the Y1 subtype of neuropeptide Y receptors. **Regulatory Peptide** v. 95, p. 47–52, 2000.

QUINTON, N. D.; SMITH, R. F.; CLAYTON, P. E.; GILLS, M. S.; SHALET, S.; JUSTICE, S. K.; SIMON, S. A.; WALTERS, S.; POSTEL-VINAY, M. C.; BLAKEMORE, A. I. F.; ROSS, R. J. M. Leptin binding activity changes with age: The link between leptin and puberty. **Endocrinology**, v. 84, p. 2336–2341, 1999.

RAHE, C. H.; OWENS, R. E.; FLEEGER, J. L.; NEWTON, H. J.; HARMS, P. G. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. **Endocrinology**, v. 107, p. 498-503, 1990.

REICHLIN, S. Neuroendocrinology. In: Wilson, J.D.; FOSTER, D.W. (Eds.) **Textbook of endocrinology**, Philadelphia 1, Saunders Company, 8 ed. 1992, p.135-219.

ROCHE, J.F. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.1, n.1, p.19-27, 1996.

RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRICK, L. A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biology of Reproduction**, v. 66 p. 603-609, 2002.

RUTTER, L. M.; SNOPEK, R.; MANNNS, J. G. Serum concentrations of IGF-I in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 2060–2066, 1989.

SAHU, A.; KALRA, P. S.; KALRA, S. P. Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. **Peptides**, v. 9, p. 83–86, 1988.

SAINSBURY A.; SCHWARZER C.; COUZENS M.; JENKINS A.; OAKES S. R.; ORMANDY C. J.; HERZOG, H. Y4 receptor knockout rescues fertility in ob/ob mice. **Genes & Development**, v. 16, n. 9, p. 1077-1088, 2002.

SAMBROOK, J. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 3. ed. : Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, , 2001.

SASAKI, A.; YASUKAWA, H.; SUZUKI, A.; KAMIZONO, S.; SYODA, T.; KINJYO, I.; SASAKI, M.; JOHNSTON, J. A.; YOSHIMURA, A. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. **Genes to Cells**, v. 4, p. 339-351, 1999.

SCHAMS, I.; SCHALLENBERGER, E.; GOMBE, S.; KARG, H. Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 103-110, 1981. Supplement.

SCHILLO, K.K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v.70, n.4, p.1271-1282, 1992.

SCHWARTZ, M. W.; BASKIN, D. G.; BUKOWSKI, T. R.; KUIJPER, J. L.; FOSTER, D.; LASSER, G.; PRUNKARD, D. E.; PORTE JR., D.; WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; *et al.* Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. **Diabetes**, v. 45, p. 531–535, 1996.

SCHWARTZ, M. W.; PESKIND, E.; RASKIND, M.; BOYKO, E. J.; PORTE JR., D. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. **Nature Medicine**, v. 5, p. 589–593, 1996.

SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A.; STAIGMILLER, R. B.; CUSTER, E. E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 799–816, 1990.

SILVA, L. F. P.; VANDEHAAR, M. J.; WEBER NIELSEN, M. S.; SMITH, G. W. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3277–3286, 2002.

SILVA, L. F. P. Estudo do genoma bovino por microarrays. In: SIMPÓSIO EM INICIATIVAS EM PESQUISAS GENÔMICAS DE BOVINOS; CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003. Águas de Lindóia, SP, 2003. p. (apresentação oral)

SILVA, L.F.P.; CARVALHO, M.V. DINIZ-MAGALHÃES, J. Crescimento e puberdade de novilhas zebuínas. **Novos desafios da Pesquisa em Nutrição Animal**, p. 162-190, 2009. 215 p.

SNYDER, J. L.; CLAPPER, J. A.; ROBERTS A. J.; SANSON, D. W.; HAMERNIK, D. L.; MOSS, G. E. Insulin-like growth factor-i, insulin-like growth factor-binding proteins, and gonadotropins in the hypothalamic-pituitary axis and serum of nutrient-restricted ewes. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 219–224, 1999.

STAGG, K. **Anoestrus in the post-partum suckled beef cow and in the nutritionally restricted beef heifer**. Ph.D. Dissertation. The National University of Ireland, Dublin, 2000.

STARR, R.; WILLSON, T. A.; VINEY, E. M.; MURRAY, L. J.; RAYNER, J. R.; JENKINS, B. J.; GONDA, T. J.; ALEXANDER, W. S.; METCALF, D.; NICOLA, N. A.; HILTON, D. J. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. **Nature**, v. 387, p. 917–921, 1997.

STEPHENS, T. W.; BASINSKI, M.; BRISTOW, P. K.; BUE-VALLESKEY, J. M.; BURGETT, S. G.; CRAFT, L.; HALE, J.; HOFFMANN, J.; HSIUNG, H. M.; KRIAUCIUNAS, A.; et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. **Nature**, v. 377, p. 530–532, 1995.

SUZUKI, R.; SAKAMOTO, H.; YASUKAWA, H.; MASUHARA, M.; WAKIOKA, T.; SASAKI, A.; YUGE, K.; KOMIYA, S.; INOUE, A.; YOSHIMURA, A. CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT-3 activation in M1 leukemia cells. **Oncogene**, v. 17, p. 2271-2278, 1998.

TARTAGLIA, L.A. The leptin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 6093–6096, 1997.

TATEMOTO, K.; CARLQUIST, M.; MUTT, V. NeuropeptideY—anovel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. **Nature**, v. 296, p. 659–660, 1982.

TATEMOTO, K.; MUTT, V. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. **Nature**. v. 285, 1980.

THALLMAN, R. M.; CUNDIFF, L. V.; GREGORY, K. E.; KOCH, R. M. Germplasm evaluation in beef cattle – cycle IV: Post weaning growth and puberty in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2651-2659, 1999.

THOMAS, M. G.; GAZAL, O. S.; WILLIAMS, G. L.; STANKO, R. L.; KEISLER, D. H. Injection of neuropeptide Y into the third cerebroventricle differentially influences pituitary secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 16, n. 3, p. 159-169, 1999.

VAICIUNAS, A.; COUTINHO, L. L.; MEIRELLES, F. V.; PIRES, A. V.; SILVA, L. F. P. Leptin and hypothalamic gene expression in early- and late-maturing *Bos indicus* heifers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 657-664, 2008.

VOGEL, W.; LAMMERS, R.; HUANG, J.; ULLRICH, A. Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. **Science**, v. 259, p. 1611–1614, 1993.

WADE, G. N.; SCHNEIDER, J. E. Metabolic fuels and reproduction in female mammals. **Neuroscience Biobehavior Review**, v. 16, p. 235–272, 1992.

WEBB, R.; GONG, J.G.; LANG, A.S. et al. Control of ovarian function in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl.45, p.141-156, 1992.

WEBER, E. T.; REA, M. A. Neuropeptide Y blocks light-induced phase advances but not delays of the circadian activity rhythm in hamsters. **Neuroscience Letters**, v. 231, p. 159–162, 1997.

WEINBERG, D. H.; SIRINATHSINGHJI, D. J.; TAN, C. P.; SHIAO, L. L.; MORIN, N.; RIGBY, M. R.; HEAVENS, R. H.; RAPOPORT, D. R.; BAYNE, M. L.; CASCIERI, M. A.; STRADER, C. D.; LINEMEYER, D. L.; MACNEIL, D. J. Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. **J. Biol. Chem**, v. 271, p. 16435–16438, 1996.

WETTEMANN, R.P.; LENTS, C.A.; CICCIOLO, N.H. et al. Nutritional and suckling-mediated anovulation in beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 81, Suppl. 2, n. 14p. E48-E59, 2003.

WETTEMANN, R.P.; BOSSIS, I. “**Energy intake regulates ovarian function in beef cattle**” (2000). Disponível em: <<http://www.asas.org/symposia/98-99proc.htm>>.

WHITE, D. W.; KUROPATWINSKI, K. K.; DEVOS, R.; BAUMANN, H.; TARTAGLIA, L. A. Leptin receptor (Ob-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence

for receptor homo-oligomerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 4065–4071, 1997.

WHITE, J. D. Neuropeptide Y: a central regulator of energy homeostasis. **Regulatory Peptides**, v. 49, n. 2, p. 93-107, 1993.

WILSON, M. E. IGF-I administration advances the decrease in hypersensitivity to oestradiol negative feedback inhibition of serum LH in adolescent female rhesus monkeys. **Journal Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 121-130, 1995.

WISIALOWSKI, T.; PARKER, R.; PRESTON, E.; SAINSBURY, A.; KRAEGEN, E.; HERZOG, H.; COONEY, G. Adrenalectomy reduces neuropeptide Y induced insulin release and NPY receptor expression in the rat ventromedial hypothalamus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 1253– 1259, 2000.

WOLFINGER, R. D.; GIBSON, G.; WOLFINGER, E. D.; BENNETT, L.; HAMADEH, H.; BUSHEL, P.; AFSHARI, C.; PAULES, R. S. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. **Journal of Computational Biology**, v. 8, n. 6, p. 625-637, 2001.

WYNNE, K.; STANLEY, S.; MCGOWAN, B.; BLOOM, S. Appetite control. **Journal of Endocrinology**, v. 184, n. 2, p. 291-318, 2005.

YANG, Y. H.; DUDOIT, S.; LUU, P.; LIN, D. M.; PENG, V.; NGAI, J.; SPEED, T. P. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 4;5, p. , 2002.

YASUKAWA, H.; MISAWA, H.; SAKAMOTO, H.; MASUHARA, M.; SASAKI, A.; WAKIOKA, T.; OHTSUKA, S.; IMAIZUMI, T.; MATSUDA, T.; IHLE, J. N.; YOSHIMURA, A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. **EMBO Journal**, v. 18, p. 1309-1320, 1999.

YASUKAWA, H.; SASAKI, A.; YOSHIMURA, A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. **Annual Review of Immunology**. v. 18, p. 143–164, 2000.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART JR., C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 85, p. , 2006.

ZABOLOTNY, J. M.; BENCE-HANULEC, K. K.; STRICKER-KRONGRAD, A.; HAJ, F.; WANG, Y.; MINOKOSHI, Y.; KIM, Y. B.; ELMQUIST, J. K.; TARTAGLIA, L. A.; KAHN, B. B.; NEEL, B. G. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. **Developmental Cell**, v. 2, p. 489–495, 2002.

ZHANG, Y.; PROENCA, 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.; WILLIAMS, G. L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 166–185, 2005.