MARINA VIEIRA DE CARVALHO

Efeito do fornecimento crônico de leptina e da nutrição na maturação sexual de novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*)

Pirassununga

2009

MARINA VIEIRA DE CARVALHO

Efeito do Fornecimento Crônico de Leptina e da Nutrição na Maturação Sexual de Novilhas Zebuínas (*Bos taurus indicus*)

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 titulo 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

2009

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.2220
FMVZ

Carvalho, Marina Vieira de
Efeito do fornecimento crônico de leptina e da nutrição na maturação sexual de novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*) / Marina Vieira De Carvalho. -- 2009.
115 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

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

1. Leptina. 2. Energia. 3. Novilha. 4. Nelore. 5. Puberdade. 6. Composição corporal. 7. Consumo. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do fornecimento crônico da leptina e da nutrição sobre a precocidade sexual de novilhas zebuínas (*Bos indicus*)", protocolado sob o nº1050/2007, utilizando 32 (trinta e dois) 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 em reunião do dia 07/02/07".

(We certify that the Research "Effect of nutrition and chronic leptin administration on sexual maturation of (*Bos indicus*) heifers", protocol number 1050/2007, utilizing 32 (thirty two) 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 Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 02/07/2007).

São Paulo, 07 de fevereiro de 2007

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

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CARVALHO, Marina Vieira de
Titulo: Efeito do fornecimento crônico de leptina e da nutrição na maturação sexual de novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*)

Data:___/___/____

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 titulo de Mestre em Ciências

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Assinatura:_____

À minha mãe Marcia de Castro Sebastião, a pessoa mais importante da minha vida e à quem devo tudo que sou, pelo carinho, dedicação e amor. Por me ensinar a ser uma pessoa forte e nunca fugir diante das adversidades. Por ensinar que a felicidade depende, antes de tudo, de nós mesmos e por apoiar minha decisão de abandonar tudo para seguir o sonho de ser médica veterinária;

À minha avó Maria (Vó Maria), que em minha vida torceu e rezou por mim em cada novo desafio e conquista, fossem elas pequenas ou grandes;

Ao meu avô Mário, que apesar de não estar mais conosco, tenho certeza que olha por mim;

À toda a minha família, minha tia Mila, meu irmão Carlos, minhas tias Maraisa e Mara, meu tio José Manoel,minhas primas Mariana, Beatriz e Isabel por sempre me apoiarem e incentivarem;

Aos grandes amigos Edgar Pavão, José Antônio Cuel e José Roberto Balduíno, sempre dispostos a me ajudar no que fosse preciso, apoiando, ouvindo e aconselhando nas horas difíceis;

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, que acompanha meu caminho desde a graduação, ensinando-me a importância do esforço e dedicação ao trabalho, da humildade e respeito para com as pessoas e da preservação da confiança e da cordialidade no trabalho e na vida;

Dedico este trabalho com imensa gratidão

AGRADECIMENTOS

À Deus por tornar tudo possível;

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pela oportunidade da realização deste curso;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo, que gerou tranqüilidade e possibilitou a dedicação intensa e exclusiva a este trabalho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, pela orientação, competência e profissionalismo, pelos ensinamentos, confiança e dedicação. Acima de tudo, por provocar o desejo de estar sempre estudando e buscando conhecimento e superação profissional;

Ao meu namorado José Esler (Cherrie), mais que tudo um companheiro, sempre paciente e compreensivo, me ajudando e apoiando em todas as horas, me ensinando a enxergar a vida com esperança e bom humor, e por me fazer querer ser uma pessoa melhor;

Aos colegas de mestrado Samuel, Diego e Juliane pela imprescindível, incontestável, e essencial ajuda em todas as etapas deste trabalho;

Aos pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal (VRA), Lindsay, José Rodrigo e Fernando Pardo, pelos ensinamentos e pelo socorro prestado sempre que necessário;

À Gabriela, estudante de Iniciação Científica, pelos fins de semana trabalhando, sempre com bom humor e disposição, cuja ajuda foi impresindível para a finalização desse projeto;

À colega de mestrado Daniela e à aluna de Iniciação Científica, Bia, pelo auxílio durante as análises de carcaça;

Aos colegas de mestrado Jefferson e Leonardo, pela ajuda e pela companhia no laboratório de bromatologia;

Aos funcionários do setor de animais fistulados, Ricardo, Zanquetin, João, Seu Manoel e Gilmar, pela amizade, boa vontade e empenho em ajudar durante o período experimental;

À todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP);

Ao Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, pela atenção e conselhos durante o curso;

À Prof. Dra. Angélica Simone Cravo Pereira, pela amizade e grande auxílio durante as análises;

Ao Prof. Dr. Ed Hoffman Madureira, pela atenção, conselhos e ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Leme, pela atenção, disponibilidade e boa vontade;

Ao Dr. Guilherme Fernando Alleoni, do Laboratório de Classificação e Análise de Carcaças do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, pela disponibilidade e auxílio nas análises de carcaças;

Aos funcionários da Secretaria do VNP, Sr. José Francisco M. Ferreira e Sra. Alessandra de Cássia T. da Silva, pelo apoio e atenção dispensadas;

Ao funcionário da Secretaria da Pós-Graduação, João Paulo, pelo auxílio e boa vontade durante os trâmites finais para deposição da dissertação;

Ao Sr. Ari Luiz de Castro, Sr. Gilson Luiz Alves de Godoy, Sra. Simi Luiza Durante Aflalo Robassini, funcionários do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, pelo imprescindível auxílio na realização das análises laboratoriais;

Aos funcionários do Setor de Bovinocultura de Corte da Cooredenadoria do Campus Administrativo de Pirassununga – PCAPS, Ismael, Paulinho, Ricardo e Roberlei, obrigada pela atenção dispensada;

Ao Carlinhos, funcionário do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, pela amizade e auxílio sempre que necessário;

Aos funcionários da Fábrica de Ração da PCAPS, Srs. Cláudio de Jesus Aparecido São Romão, Israel Andrietta e José Luiz Aparecido Landgraf, agradeço a atenção dispensada;

Ao Dr. Fernando Schalch, Médico Veterinário da PCAPS, pelo auxílio durante a condução do experimento;

Aos meus colegas, Cris, Milton, Érica, Bruno Botaro, Carol, pela convivência e pelos momentos de descontração, porque sozinhos não somos nada;

À todos os colegas e estagiários que me auxiliaram na realização deste trabalho.

Três coisas trazem a infelicidade: saber e não ensinar; ensinar e não fazer; ignorar e não perguntar.

RESUMO

CARVALHO, M. V. **Efeito do fornecimento crônico de leptina e da nutrição na maturação sexual de novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*).** [Effect of Chronic Leptin Administration on Sexual Maturation of Zebu Heifers (Bos taurus indicus)]. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

O objetivo deste estudo foi avaliar o fornecimento crônico de leptina recombinante ovina (oLeptina) e do nível de energia da dieta na idade, peso vivo (PV), escore de condição corporal (ECC) e composição corporal à puberdade, assim como avaliar seus efeitos no desenvolvimento dos folículos ovarianos e no consumo de matéria seca (CMS). Foram utilizadas 36 novilhas da raça Nelore, com média de 18 a 20 meses de idade, 276,1 ± 17,9 kg PV e ECC de 4,7 ± 0,46, distribuídas aleatoriamente em três tratamentos: A) Dieta de alta energia; B) Dieta de baixa energia, BL) Dieta de baixa energia com administração subcutânea de oLeptina. Os animais foram alojados de 2 baias coletivas de acordo com a dieta oferecida. As dietas foram formuladas para promover um ganho de peso médio diário (GMD) de 0,3 kg PV/dia e 1,0 kg PV/dia. O controle de consumo foi feito através da pesagem diária das sobras e manutenção dessas entre 5 e 10% do total oferecido. Os animais foram pesados e tiveram o ECC avaliado duas vezes por semana, para acompanhamento do GMD. Foi administrado 12 g de óxido de cromo/animal/dia por deglutição forçada por 10 dias, com coleta de amostras de fezes, dieta e sobras nos últimos 5 dias, para estimativa do consumo individual de MS e energia, através da determinação do cromo nas fezes e do FDNi nas fezes, dietas e sobras. O grupo BL recebeu 4,8 µg de oLeptina/kg PV, via subcutânea, duas vezes ao dia (6:00 e 18:00 horas) por 56 dias, enquanto os grupos A e B receberam 2 ml de solução salina. O diâmetro máximo do folículo dominante (FD) e a presença de corpo lúteo (CL) foram avaliados através de ultrassonografia transretal duas vezes por semana, até o momento da puberdade. No momento da ultrassonografia, foram coletadas amostras de sangue, por punção da veia jugular, para dosagem da concentração sérica de progesterona. A idade à puberdade foi considerada como a idade na primeira detecção de um CL, confirmado como sendo funcional por dosagem de progesterona acima de 1 ng/ml. Após a confirmação da puberdade os animais foram abatidos para estimativa da composição corporal, através da determinação do teor de água em cortes da 9a-10a-11a costelas. O maior teor de energia na dieta reduziu a idade e aumentou o ECC à puberdade ($P<0,05$). A leptina não teve efeito na idade, PV ou ECC à puberdade ($P>0,05$). Tanto o maior consumo de energia quanto a leptina aumentaram a

velocidade de crescimento e determinaram maior diâmetro médio do FD (P<0,05), entretanto a velocidade de crescimento do FD do grupo BL voltou a diminuir, igualando-se à do grupo BL, após cerca de 30 dias de tratamento, comportando-se de forma quadrática à análise de regressão. O maior consumo de energia determinou maior teor de extrato etéreo e menores teores de proteína, matéria seca e matéria mineral no corpo vazio, além de maior espessura de gordura subcutânea e área de olho de lombo na carcaça (P<0,05). A aplicação de leptina não alterou a composição corporal das novilhas à puberdade (P>0,05). Não houve diferença no CMS (kg MS/dia) entre os grupos, entretanto o grupo A teve menor CMS em % PV, além de maior consumo de energia digestível, metabolizável e líquida para ganho (P<0,05). A leptina não reduziu o CMS das novilhas (P>0,05) tanto em kg MS/dia quanto em % PV. A energia acelera a obtenção da puberdade e altera a composição corporal à puberdade de novilhas zebuínas. A aplicação de leptina não acelerou a obtenção da puberdade de novilhas zebuínas em baixo consumo de energia, mas aumentou temporariamente a taxa de crescimento folicular desses animais.

Palavras-chave: Leptina. Energia. Novilha. Nelore. Puberdade. Composição Corporal. Consumo.

ABSTRACT

CARVALHO, M. V. **Effect of Chronic Leptin Administration on Sexual Maturation of Zebu Heifers (Bos taurus indicus).** [Efeito do fornecimento crônico de leptina e da nutrição na maturação sexual de novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*)]. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

This study was carried out to evaluate the effects of chronic administration of recombinant ovine leptin (oLeptin) and the energy level of the diet on age, body weight (BW), body condition score (BCS) and body composition at puberty, as well as to evaluate its effects on dominant follicle (DF) development and dry matter (DM) intake. Thirty six Nellore heifers, 18 to 20 months old, with 276.1 ± 17.9 kg BW and BCS of 4.7 ± 0.46 were randomly distributed into three treatments: H) High energy diet; L) Low energy diet; LL) Low energy diet with subcutaneous administration of oLeptin. Heifers were housed in two collective pens according to the diet offered. Diets were formulated to promote an average daily gain (ADG) of 0.3 kg BW/day and 1.0 kg BW/day. Intake was controlled daily by weighting the orts and keeping it between 5 and 10% of the total offered. Heifers were weighed and had their BCS was evaluated twice weekly, in order to control the ADG. Heifers received 12 g of chromic oxide/animal/day by forced swallowing for 10 days, while feces, diet and orts were sampled in the last 5 days, in order to estimate individual DM and energy intake, which was done by feces determination of chromic oxide, and diet and, feces and orts determination of iNDF. The LL group received 4.8 µg oLeptina/kg BW, subcutaneously, twice a day (at 06:00 and 18:00), for 56 days, while H and L groups received 2 ml of saline solution. Maximum DF diameter and presence of corpus luteum (CL) were evaluated twice weekly by transrectal ultrasound, until heifers achieved puberty. At the time of ultrasound evaluation, blood was sampled by jugular venipuncture for serum progesterone determination. Age at puberty was considered as age at first detection of a CL confirmed to be functional by serum progesterone above 1 ng/ml. After puberty confirmation heifers were slaughtered for body composition estimation, which was done by water determination on 9a-10a-11a rib cuts. High energy intake reduced age and enhanced BCS at puberty ($P<0.05$). Leptin administration did not affect age, BW or BCS at puberty ($P>0.05$). The high energy intake as well as leptin administration accelerated the DF growth and determined greater DF diameter ($P<0.05$), however the rate of growth on the LL group decreased after around 30 days of treatment equaling the rate of growth of the L group, and behaving in a quadratic manner at regression analysis. High energy intake

enhanced ether extract and lowered protein and minerals proportion on empty body ($P<0.05$). It also enhanced carcass subcutaneous fat and the longissimus muscle area ($P<0.05$). Leptin administration did not alter the body composition of heifers at puberty ($P>0.05$). There was no difference on DM intake (kg DM/day) between groups, however the H group had higher DM intake in terms of % BW, as well as higher intake of digestible, metabolizable and net energy for gain ($P<0.05$). Leptin did not reduce DM intake neither in terms of kg BW/day nor % BW ($P>0.05$). Energy intake accelerates the onset of puberty and alters body composition at puberty of zebu heifers. Leptin administration did not accelerate puberty onset of zebu heifers receiving low energy diet, but temporarily enhanced the follicular growth rate of these animals.

Keywords: Leptin. Energy. Heifer. Nellore. Puberty. Body composition. Feed intake.

LISTA DE TABELAS

Pág

Tabela 1- teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro livre de cinzas (FDNc), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), lignina (LIG), carboidratos não fibrosos livre de cinzas (CNFc), carboidratos totais (CHO), matéria mineral (MM), nutrientes digestíveis totais (NDT), energia bruta (EB) e energia líquida de ganho (ELg) das dietas experimentais..... 55

Tabela 2- composição percentual dos ingredientes e teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro livre de cinzas (FDNc), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), lignina (LIG), carboidratos não fibrosos livre de cinzas (CNFc), carboidratos totais (CHO), matéria mineral (MM), nutrientes digestíveis totais (NDT), energia bruta (EB) e energia líquida de ganho (ELg) das dietas experimentais..... 56

Tabela 3- cronograma de atividades semanais..... 64

Tabela 4- idade (Ii), peso vivo (Pvi) e escore de condição corporal (ECCi) iniciais médios; ganho de peso vivo médio diário (GMD); idade (Iov), peso vivo (PVov) e escore de condição corporal (ECCov) médios à ovulação; número médio de dias em experimento (Dias exp.) Até a ovulação de novilhas zebuínas de acordo com os tratamentos..... 66

Tabela 5- intercepto, componente linear e componente quadrático das equações de regressão do diâmetro máximo do folículo dominante dos tratamentos em função do tempo..... 74

Tabela 6- idade (Iab), peso vivo (PVab) e escore de condição corporal (ECCab) médios ao abate; peso de carcaça quente (PCQ); peso de carcaça fria (PCF); área de olho de lombo (AOL); espessura de gordura subcutânea (EGS); e proporção de água (H_2O CVz), matéria seca (MS CVz), extrato etéreo (EE CVz), proteína (Ptn CVz) e matéria mineral (MM CVz) no corpo vazio de novilhas zebuínas de acordo com os tratamentos..... 83

Tabela 7- produção total de fezes (MSF), digestibilidade da dieta (Digest), consumo individual médio de matéria seca (CMS), consumo de energia bruta (CEB), consumo de energia digestível (ced), consumo de energia metabolizável (CEM), consumo de energia líquida de ganho (CELg), consumo de ndt (CNDT) e eficiência de conversão de energia para ganho por tratamento..... 88

LISTA DE FIGURA

Pág

Figura 1- Envolvimento da leptina na regulação neuroendócrina da secreção de LH..... 42

Figura 2- Vista da secção das 9ª-10ª-11ª costelas (seção HH), através de um corte perpendicular à coluna vertebral entre a 8ª e a 9ª e entre a 11ª e a 12ª costelas..... 61

Figura 3- Período experimental total (Dietas e Ultrassom), paríodo de aplicação de leptina e período de administração de óxido de cromo..... 64

Figura 4- Taxa de ovulação dos três tratamentos de acordo com o tempo. A – dieta de alta energia (●); B – dieta de baixa energia (■); BL – dieta de baixa energia + 4,8 µg oLeptina/kg PV (▲)..... 67

Figura 5- Efeito dos tratamentos no diâmetro máximo do folículo dominante (cm). A – dieta de alta energia (●), B – dieta de baixa energia (■); BL – dieta de baixa energia + 4,8 µg oLeptina/kg PV (△)..... 73

.

Figura 6- Linhas de tendência, equações de regressão e coeficientes de variação (R^2) do diâmetro máximo do folículo dominante (cm) em função do tempo, durante o período de aplicação de leptina, de acordo com os diferentes tratamentos. A – dieta de alta energia (●), B – dieta de baixa energia (■); BL – dieta de baixa energia + 4,8 µg oLeptina/kg PV (△).... 74

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AGd	Ácidos graxos digestíveis
AOL	Área de olho de lombo
CCK	Colecistoquinina
CEB	Consumo de energia bruta
CED	Consumo de energia digestível
CEM	Consumo de energia metabolizável
CHO	Carboidratos totais
CL	Corpo lúteo
CMS	Consumo de matéria seca
CNDT	Consumo de nutrientes digestíveis total
CNFc	Carboidratos não fibrosos livre de cinzas
CNFd	Carboidratos não fibrosos digestíveis
CVz	Corpo vazio
DF	Diâmetro folicular
DIG	Digestibilidade
EB	Energia bruta
ECC	Escore de condição corporal
ED	Energia digestível
EE CVz	Extrato etéreo no corpo vazio
EE	Extrato etéreo
EGS	Espessura de gordura subcutânea
ELg	Energia líquida de ganho
EM	Energia metabolizável
FD	Folículo dominante
FDNc	Fibra em detergente neutro livre de cinzas
FDNd	Fibra em detergente neutro digestíveis
FDNi	Fibra em detergente neutro indigestível
FSH	Hormônio folículo estimulante
GABA	Ácido gama aminobutírico

GH	Hormônio de crescimento
GMD	Ganho de peso médio diário
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
H2O CVz	Água no corpo vazio
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina I
IL-6	Interleucina 6
IPP	Idade ao primeiro parto
JAK	Janus quinase
LH	Hormônio luteinizante
LIG	Lignina
MM CVz	Matéria mineral no corpo vazio
MM	Matéria mineral
MO	Materia orgânica
MS CVz	Matéria seca no corpo vazio
MS	Matéria seca
MSF	Matéria seca fecal total
MSH	Hormônio estimualador de melanócitos
NDT	Nutrientes digestíveis totais
NIDA	Nitrogênio insolúvel em detergente ácido
NIDN	Nitrogênio insolúvel em detergente neutro
NPY	Neuropeptídeo Y
OB-R	Receptor de leptina
oLeptina	Leptina recombinante ovina
PB	Proteína bruta
PBd	Proteína bruta dogestível
PCF	Peso de carcaça fria
PCQ	Peso de carcaça quente
PCVz	Peso de corpo vazio
PFT	Produção fecal total
POMC	Proopiomelanocortina
Ptn CVz	Proteína no corpo vazio
PV	Peso vivo
RIA	Radioimunoensaio

RNA	Ácido ribonucléico mensageiro
STAT	Transdutores de sinal e estimuladores da transcrição
TNT	Tecido não-tecido

SUMÁRIO

Pág.

1 INTRODUÇÃO..... 22
REFERÊNCIAS..... 24

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS……...……..... 26

3 REVISÃO DE LITERATURA..... 27
3.1 **Pecuária de Corte Brasileira**..... 27
3.1.1 Desempenho Reprodutivo..... 28
3.2 **Fisiologia da Puberdade**..... 30
3.2.1 Relação entre Nutrição e Puberdade..... 31
3.2.2 Sinalização do Status Nutricional ao Eixo Reprodutivo..... 34
3.3 **Leptina**..... 37
3.3.1 Modelo Murino..... 38
3.3.2 Mecanismo de Ação da Leptina no Sistema Nervoso Central..... 39
3.3.3 Relação entre Leptina, Nutrição e Função Reprodutiva..... 43
3.3.4 Papel da Leptina na Obtenção da Puberdade..... 46
3.4 **Função Ovariana**..... 48
3.4.1 Efeito da Nutrição no Desenvolvimento Folicular..... 50
3.4.2 Efeito Periférico da Leptina na Função Ovariana..... 51

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 53
4.1 **Local, Instalações e Animais**..... 53
4.2 **Dietas**..... 53
4.3 **Tratamento Hormonal**..... 57
4.4 **Estimativa de Consumo**..... 58
4.5 E**stimativa da Composição Corporal**..... 60
4.6 **Análise Estatística**..... 63
4.9 **Cronograma de Atividades**..... 64

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 65
5.1 **Puberdade**..... 65
5.2 **Função Ovariana**..... 72
5.3 **Consumo e Composição Corporal**..... 81

6 CONCLUSÕES..... 91

REFERÊNCIAS..... 92

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte responde por cerca de 10% da produção agropecuária total brasileira (Censo Agropecuário 2006, IBGE). Além de possuir o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de 171,6 milhões de cabeças em 2006 (Censo Agropecuário 2006, IBGE), o Brasil ainda é considerado o maior exportador mundial de carne bovina (1,23 milhões de toneladas em 2006), superando inclusive a Austrália.

Hoje, a raça Nelore (*Bos taurus indicus*) é a mais difundida no Brasil, apresentando grande importância no crescimento da pecuária de corte nacional. Apesar de bem adaptado às condições tropicais, entretanto, o Nelore pode ser considerado sexualmente tardio, pois atinge a puberdade com idade mais avançada que raças européias (*Bos taurus taurus*), mesmo quando criados em condições semelhantes (THALLMAN et al., 1999; RODRIGUES et al., 2002).

A reprodução é um dos principais fatores determinantes da lucratividade e limitantes do desempenho da atividade pecuária (OLIVEIRA et al., 2003; SILVA, 2005), sendo que o início da atividade reprodutiva de fêmeas de corte influencia diretamente a rentabilidade da criação de bezerros de reposição, além de ser um dos principais responsáveis pela baixa taxa de desfrute do rebanho brasileiro. A idade ao primeiro parto (IPP) depende diretamente da idade à puberdade, a qual, por sua vez, sofre influência de diversos fatores externos, como nutrição e a estação do ano (fotoperíodo), por exemplo.

Tanto em novilhas *Bos indicus* (RODRIGUES et al., 2002) como em novilhas *Bos taurus* (EVANS et al., 1994), o início da puberdade é determinado pela maturação do hipotálamo, resultando em redução do *feedback* negativo do estrogênio, maior freqüência de pulsos de hormônio luteinizante (LH) e eventual ovulação (KINDER et al., 1995). Os mecanismos fisiológicos envolvidos na maturação do hipotálamo, entretanto, ainda não são totalmente compreendidos, mas já está provado que tanto o peso vivo (PV) quanto a condição corporal influenciam claramente a idade à puberdade (MORAN et al., 1989).

Há mais de vinte anos foi proposta a existência de uma relação complexa entre índice de massa corporal (adiposidade) e controle do eixo reprodutivo central, a qual atuaria como reguladora da obtenção da puberdade e da manutenção da atividade reprodutiva normal em várias espécies (FRISCH et al., 1980; BRONSON, 1987). Recentemente postula-se que a leptina, hormônio inibidor do apetite produzido pelo tecido adiposo, seja a responsável por sinalizar a condição corporal do animal ao hipotálamo, agindo através da ligação com

receptores hipotalâmicos específicos e exercendo um efeito permissivo à obtenção da puberdade (BARASH et al., 1996).

Vários fatores indicam que a leptina seja o elo entre nutrição e reprodução. A concentração sangüínea de leptina em bovinos jovens é positivamente correlacionada com a quantidade das reservas corporais de energia (tecido adiposo) (EHRHARDT et al., 2000) e com a ingestão de calorias (BLACHE et al., 2000); a leptina sérica aumenta naturalmente conforme a puberdade se aproxima, em diversas espécies (GARCIA et al., 2000; DIAZ-TORGA et al, 2001); a presença de leptina é um requerimento essencial para a obtenção da puberdade em humanos (CUNNINGHAM et al., 1999). Além disso, observa-se que a administração de leptina exógena é capaz de induzir a puberdade em roedores e resgatar camundongos geneticamente obesos da esterilidade (CHEHAB et al., 1997; MOUNZIH et al., 1997).

Diversas linhas de pesquisa apontam a leptina como principal limitante da maturação sexual em novilhas mal alimentadas. Estudos demonstraram que a restrição alimentar reduz a concentração basal e a pulsatilidade do LH e que a administração de leptina exógena reverte o quadro (NAGATANI et al., 1998; AMSTALDEN et al., 2002; ZIEBA et al., 2004), e sugerem que animais com maior expressão de leptina no tecido adiposo podem atingir a puberdade mais cedo, com menor peso vivo (PV) (VAICIUNAS, 2007). Observa-se que a leptina age diretamente no hipotálamo e possivelmente também na hipófise, estimulando a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e do LH durante o estado de subnutrição, não sendo capaz de acelerar a puberdade em novilhas bem alimentadas (MACIEL et al., 2004a; ZIEBA et al., 2004).

A elucidação do mecanismo regulador da precocidade sexual de fêmeas Nelore é imprescindível para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos de indução da puberdade, ou para programas de seleção genética mais eficazes na produção de linhagens de bovinos precoces, visando aumentar a eficiência da produção de novilhos de corte. A redução na idade ao primeiro parto e o aumento na taxa de prenhez de vacas no pós-parto podem aumentar significativamente a taxa de desfrute do rebanho bovino brasileiro.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

CUNNINGHAM, M. J.; CLIFTON, D. K.; STEINER R. A. Leptin's actions on the reproductive axis: Perspectives and mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 216-222, 1999.

DÍAZ-TORGA, G. S.; MEJÍA, M. E.; GONZÁLEZ-IGLESIAS, A.; FORMÍA, N.; BECÚ-VILLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I. M. Metabolic cues for puberty onset in free grazing holstein heifers naturally infected with nematodes. **Theriogenology,** v. 56, n. 1, p. 111-122, 2001.

EHRHARDT, R. A.; SLEPETIS, R. M.; SIEGAL-WILLOTT, J.; VAN AMBURGH, M. E.; BELL, A. W.; BOISCLAIR, Y. R. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. **Journal of Endocrinology,** v.166, p. 519-28. 2000.

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.

FRISCH, R. E.; WYSHAK, G.; VINCENT L. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. **New England Journal of Medicine,** v. 3003, p. 17-9, 1980.

GARCIA, M. R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S. W.; STANKO, R. L.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H.; NIZIELSKI, S. E.; WILLIAMS, G. L. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science,** v. 80, n. 8, p. 2158-2167, 2002.

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 Suppl., p. 393-407, 1995.

MACIEL, M. N.; ZIEBA, D. A.; AMSTALDEN, M.; KEISLER, D. H.; NEVES, J. P.; WILLIAMS, G. L. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. **Journal of Animal Science,** v.82, p. 2930-2936, 2004a.

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 the sterility of genetically obese *ob/ob* males. **Endocrinology,** v. 138, n. 3, p. 1190-1193, 1997.

NAGATANI, S.; ZENG, Y.; KEISLER, D. H.; FOSTER, D. L.; JAFFE, C. A. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. **Endocrinology,** v. 141, p. 3965-75. 2000.

.

OLIVEIRA, C. M. G.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GAMBARINI, L. M.; KUNZ, T. L.; VIU, M. A. Índice de gestação em novilhas Nelore que atingiram a puberdade em idade precoce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 237-239, 2003.

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.

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

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.

VAICIUNAS, A. **Expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore precoces e não precoces**. 2007. 65 p. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

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

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

A hipótese apresentada neste estudo é que a elevação da concentração sérica de leptina, tanto pela administração exógena quanto pelo aumento no consumo de energia na dieta, acelera a obtenção da puberdade em novilhas zebuínas.

2.2. Objetivos

Avaliar os efeitos da administração de leptina recombinante ovina na idade, peso vivo, escore de condição corporal, composição corporal, consumo e digestibilidade de matéria seca em novilhas zebuínas recebendo dieta com baixo teor de energia.

Avaliar os efeitos da alta ingestão de energia na dieta na idade, peso vivo, escore de condição corporal, composição corporal, consumo e digestibilidade de matéria seca em novilhas zebuínas.

Avaliar os efeitos periféricos da leptina e do nível de energia da dieta no desenvolvimento dos folículos ovarianos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pecuária de Corte Brasileira

Cerca de 80% de todo o rebanho bovino brasileiro é composto por animais zebuínos (*Bos taurus indicus*) ou cruzados com zebuínos. Dentre estes, o Nelore é a principal raça de corte e responde por 70% dos animais do país. A grande importância da raça Nelore para a pecuária brasileira é conseqüência de características específicas dos zebuínos, como a resistência às altas temperaturas e umidade, características das regiões tropicais e subtropicais, e a capacidade de digerir forragens de baixa qualidade (RAJARATNE et al., 1983), tornando-os capazes de se adaptar aos sistemas extensivos de criação e às condições climáticas encontradas na maior parte do território brasileiro (NOGUEIRA, 2004).

O início da vida reprodutiva das fêmeas de corte apresenta grande influência na rentabilidade da atividade pecuária, uma vez que o atraso na obtenção da puberdade reflete diretamente na idade ao primeiro parto (IPP). Rodrigues et al. (2002) demonstraram que animais Nelore, apesar de bem adaptados às condições tropicais, atingiram a puberdade em idade mais avançada que raças taurinas (*Bos taurus taurus*), mesmo quando criados em condições semelhantes. O fato de o peso vivo (PV) médio à puberdade da raça Nelore ser superior ao dos taurinos, indica a existência de uma diferença fisiológica entre as duas subespécies de bovinos (THALLMAN et al., 1999; RODRIGUES et al., 2002), explicando o "atraso" na idade à puberdade do Nelore, que pode chegar a 12 meses (WILTBANK et al., 1969; OYEDIPE et al., 1982; SILVA; ROMANO, 1991).

Entretanto, não se podem desconsiderar os efeitos ambientais que influenciam a maturação sexual dos zebuínos. O manejo extensivo, principal sistema de produção encontrado ainda hoje no Brasil, na maioria das vezes reduz a eficiência reprodutiva do rebanho (NEINDRE et al., 1996). A estacionalidade das forrageiras tropicais determina baixa produção de forragem, alto teor de fibra de baixa qualidade e baixo teor de proteína durante o período de seca (inverno), resultando em inúmeras deficiências alimentares (SCHMIDT, 2006; MENDES, 2006) e atraso no desenvolvimento do sistema endócrino (DAY et al., 1986). A redução dos níveis circulantes de hormônios sexuais, principalmente do hormônio luteinizante (LH), leva a falhas na maturação folicular e ovulação, e menor taxa de fertilidade (RHODES et al., 1996).

Apesar da posição de destaque da bovinocultura de corte brasileira no cenário mundial e de sua importância para a economia nacional, a taxa de abate média, em torno de 21,67%, está muito aquém do real potencial da atividade (DBO, 2005), sendo relativamente baixa quando comparada com outros países como EUA (37%) e Austrália (32%), por exemplo. Alguns fatores que colaboram com esse índice são: idade avançada ao primeiro parto, baixa fertilidade, alta taxa de mortalidade dos bezerros até a desmama e baixo ganho de peso dos animais. A melhoria nas condições de manejo, sanidade e nutrição, portanto, possibilitaria significativas melhorias no desempenho e índices produtivos e reprodutivos do rebanho (BELTRAN, 2007).

3.1.1 *Desempenho reprodutivo*

A reprodução é um dos principais fatores determinantes da lucratividade e limitantes do desempenho da atividade pecuária (OLIVEIRA et al., 2003; SILVA, 2005), sendo que as características reprodutivas têm um impacto econômico cerca de 10 vezes maior do que as características associadas ao crescimento (HILL, 1998). O atraso no início da vida reprodutiva aumenta o rebanho não produtivo da propriedade e reduz a taxa de desfrute e a eficiência da produção de bezerros, encarecendo a atividade e atrasando o processo de seleção genética (RESTLE et al., 1999). No Brasil, as baixas taxas de desfrute observadas (20-25%) são resultado, principalmente, da elevada IPP e da reduzida taxa de prenhez das matrizes (50-60%) (ANUALPEC, 2005). A melhoria no desempenho reprodutivo, através da redução da IPP, por exemplo, exerceria enorme impacto sobre a taxa de abate do rebanho.

Nos países sul-americanos, a primeira ovulação das fêmeas Nelore costuma ocorrer entre 22 e 36 meses de idade, com a primeira parição entre 44 e 48 meses (SILVA; PEREIRA, 1986; SOUZA et al., 1995; PEREIRA, 2000). Já no Estado de São Paulo, a IPP média do rebanho é cerca de 34 meses, correspondendo a uma idade à concepção de 25 meses, mesmo quando as novilhas são expostas ao touro desde os 14 meses de idade (PEREIRA et al., 2002). Um sistema baseado em IPP de 48 meses apresenta taxa de desfrute abaixo de 15% e grande número de fêmeas vazias em recria. Quando a IPP é reduzida para 36 meses, a taxa de desfrute é duplicada e se a IPP fosse reduzida ainda mais, para 27 meses, por exemplo, a taxa de desfrute aumentaria para cerca de 40% (FRIES et al., 1996). Deste modo, a elevada IPP média do rebanho brasileiro, normalmente maior que 30 meses, acaba

alongando a fase de recria e tornando a atividade pecuária de corte menos eficiente e produtiva.

A idade à puberdade, a raça e a composição genética são características importantes que irão influenciar a IPP (OLIVEIRA, 2006). Melhorias genéticas e de manejo visando à redução na idade à puberdade contribuem para o aumento da vida reprodutiva do animal e, conseqüentemente, da produção de bezerros, trazendo benefícios a toda a cadeia produtiva da carne (PATTERSON et al., 2006). Rebanhos com elevado índice de precocidade sexual e fertilidade possuem maior disponibilidade de animais para venda e permitem maior pressão de seleção, progressos genéticos mais rápidos e maior lucratividade (BERGMANN, 1998). Nos países desenvolvidos, o manejo seletivo objetiva a inseminação artificial e/ou cobertura das novilhas aos 15 meses, resultando em IPP de 24 meses e produtividade máxima (WOLFE et al., 1990; PATTERSON et al., 1992). Em experimento com novilhas Nelore, Teixeira (1997) verificou que a antecipação do primeiro parto para 27 a 30 meses aumentou em 45% a receita bruta da atividade.

A idade à puberdade, principal característica indicadora da precocidade sexual dos bovinos, pode ser considerada um dos principais referenciais para os programas de melhoramento genético de zebuínos (MACKINNON et al., 1990; MEYER et al., 1990; BERGMANN et al., 1996). Recomenda-se que novilhas de corte submetidas a níveis nutricionais adequados alcancem a puberdade entre 11 e 15 meses, no caso de raças taurinas, e entre 18 e 24 meses, no caso de raças zebuínas (HAFEZ, HAFEZ, 2004). Nogueira et al. (2003) observaram que novilhas Nelore selecionadas para precocidade sexual e em regime alimentar adequado, ovularam entre 14 e 15 meses de idade. Em rebanhos não selecionados e criados em sistemas extensivos, entretanto, essa idade certamente é muito maior.

A característica idade à puberdade possui herdabilidade relativamente alta (0,61), representando um alvo em potencial para programas de seleção genética (MCNEIL et al., 1984). No entanto, do ponto de vista prático, no campo, a caracterização da primeira ovulação é trabalhosa e de difícil inclusão na rotina das propriedades rurais, uma vez que envolve palpações retais, avaliações ultra-sonográficas e coletas de sangue para dosagens hormonais, por exemplo. A IPP também responde à pressão de seleção, no entanto, o tempo necessário para a expressão dessa característica, de dois a três anos, é um fator limitante para sua utilização como critério de seleção para precocidade sexual (BERGMANN, 1993). A identificação de variáveis fisiológicas relacionadas à puberdade de novilhas facilitará e antecipará, desta forma, o processo de seleção genética para precocidade sexual.

3.2 Fisiologia da Puberdade

A puberdade é o estágio final da maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, culminando com o fenótipo adulto (ODELL, 1992), e é marcada por alterações na concentração de gonadotrofinas e aumento nos níveis de esteróides sexuais circulantes (LEE, 1995; WU et al., 1996). A entrada na puberdade inicia a vida reprodutiva da fêmea e é caracterizada pela primeira ovulação (RAWLINGS et al., 2003), acompanhada do desenvolvimento de um corpo lúteo (CL) capaz de se manter durante um ciclo estral completo (KINDER et al., 1987).

A maturação sexual é um processo fisiológico que envolve a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, resultando na ovulação de um oócito viável. A teoria "gonadostática" da ativação hipotalâmica, aceita para ovinos (FOSTER; RYAN, 1979) e bovinos (RODRIGUES et al., 2002), descreve a ocorrência de uma dessensibilização do hipotálamo aos esteróides gonadais, resultando em aumento da secreção de gonadotrofinas (EVANS et al., 1992; KINDER et al., 1995; HONARAMOOZ, 1999; MELVIN, 1999). Sabe-se que o LH é secretado pela hipófise anterior de forma pulsátil e que sua secreção é controlada pela secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) por células neurossecretoras do hipotálamo, no sistema porta hipotálamo-hipofisário (McCANN, 1974). Desta forma, o padrão de secreção de LH reflete diretamente o padrão de secreção de GnRH (LEVINE; RAMIREZ, 1982).

Em animais jovens, a manutenção do nível basal de estradiol, produzido nos ovários, inibe a secreção dos hormônios gonadotróficos hipofisários, principalmente o LH, através de um mecanismo de *feedback* negativo sobre a secreção hipotalâmica do GnRH. Day et al. (1984) evidenciaram o efeito dos esteróides na secreção de LH ao demonstrar que novilhas pré-púberes ovariectomizadas, quando comparadas com novilhas inteiras, isto é, com ovários preservados, apresentavam maior freqüência e amplitude dos pulsos de LH, os quais voltavam a diminuir após a administração parenteral de estradiol.

Com a aproximação da puberdade, no entanto, a redução no número de receptores de estradiol no hipotálamo diminui gradativamente a sensibilidade deste ao efeito inibitório dos esteróides, resultando em aumento na secreção de GnRH e, conseqüentemente, na freqüência dos pulsos de secreção de LH. Esta redução do *feedback* negativo do estradiol pode ser considerada o fator endócrino primário necessário para o desencadeamento da puberdade em novilhas (DAY et al., 1987). O aumento na freqüência dos pulsos de LH no período peri-

puberal (30 a 80 dias antes da primeira ovulação) estimula o desenvolvimento dos folículos ovarianos. O conseqüente aumento na produção de estradiol estimula o comportamento de cio e, agora através de um mecanismo de *feedback* positivo, estimula a secreção de GnRH e LH, podendo culminar com um pico pré-ovulatório de liberação de LH e com a ovulação (KINDER et al., 1995; RAWLINGS et al., 2003).

A regulação fisiológica da maturação do hipotálamo ainda não é bem compreendida, entretanto, sabe-se que diversos fatores não genéticos como condição nutricional e metabólica, particularmente o PV e a adiposidade, assim como o fotoperíodo, por exemplo, claramente influenciam a idade à puberdade (KENNEDY; MITRA, 1963; FRISCH et al., 1973; FOSTER; RYAN, 1981; MORAN et al., 1989; KINDER et al., 1995; CHEUNG et al., 1997; EHRHARDT et al., 2000). Redmer et al. (1984) afirmou que, na verdade, a puberdade está mais relacionada com o PV que com a idade cronológica propriamente dita. Os autores observaram que bovinos de leite e de corte tornavam-se sexualmente maduros quando o PV atingia 30 a 40% e 45 a 55% do PV adulto, respectivamente. Já Yelich et al. (1996) verificaram que a restrição alimentar prolongada reduz a freqüência de pulsos de LH, essencial para o desenvolvimento folicular até o estágio pré-ovulatório, atrasando o início da puberdade e prejudicando a atividade cíclica das novilhas. A restrição alimentar também afeta a concentração de progesterona no período pré-puberal e nos primeiros dias do ciclo estral, mesmo se os níveis nutricionais forem incrementados próximo ao momento do surgimento da puberdade (PERON; FERNANDES, 1995), indicando que os fatores nutricionais agem não apenas centralmente, mas também em nível periférico, nos ovários.

3.2.1 *Relação entre nutrição e puberdade*

O sistema reprodutivo dos mamíferos é extremamente sensível à disponibilidade de alimento, sendo que alterações agudas e crônicas no status energético do animal são capazes de influenciar o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. A nutrição inadequada, particularmente o balanço energético negativo, altera as funções endócrinas e prejudica a função reprodutiva de várias espécies de mamíferos. Nos ruminantes domésticos, seus efeitos incluem atraso no início da puberdade, indução de anestro em fêmeas cíclicas, prolongamento do anestro pós-parto e redução da taxa de sobrevivência de embriões (IMAKAWA et al., 1983, 1984, 1986a; FOSTER; OLSTER, 1985; DAY et al., 1986; HOUSEKNECHT et al.,

1988; MORAN et al., 1989; RICHARDS et al., 1989; RANDEL, 1990; ESTIENNE et al., 1990; BARB et al., 1997; DUNNE et al., 1999). Em 1989, Schneider e Wade observaram que o anestro induzido pelo jejum ocorre mais rapidamente em hamsters magros que nos gordos. Considerando o enorme requerimento metabólico da gestação e lactação, o bloqueio das funções reprodutivas parece ser parte de uma estratégia efetiva para assegurar que as reservas energéticas corporais não sejam desperdiçadas em esforços reprodutivos que provavelmente não terão sucesso (CUNNINGHAM et al., 1999).

A energia é o nutriente que exerce maior influência na atividade reprodutiva de fêmeas bovinas (SANTOS, 1998), estando o desempenho reprodutivo intimamente associado ao desenvolvimento corporal adequado (BELTRAN, 2007). Experimentos com roedores, ovinos e bovinos demonstram que o atraso no crescimento, causado pela restrição alimentar crônica, resulta em atraso na obtenção da puberdade (FOSTER; OLSTER, 1985; DAY et al., 1986; CHEUNG et al., 1997). Por outro lado, se o crescimento for acelerado, devido à superalimentação, o animal atinge a puberdade mais jovem (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Segundo Imakawa et al. (1986b), a freqüência dos pulsos de LH durante a fase folicular do ciclo estral correlaciona-se positivamente com alterações no PV.

A elevação da freqüência dos pulsos de secreção de LH é necessária para a fase final da maturação dos folículos ovarianos (HANSEL; CONVEY, 1983; KINDER et al., 1987; RANDEL, 1990) e, portanto, para a indução do estro e ovulação. Diversos estudos suportam a hipótese de que a alteração no padrão de secreção de LH, através do bloqueio no aumento pré-puberal da freqüência de pulsos, é o mecanismo primário pelo qual a subnutrição atrasa a obtenção da puberdade. A supressão da secreção pulsátil de LH, após o jejum ou restrição alimentar, já foi descrita em diversas espécies, como ratos (BADGER et al., 1985; CAGAMPANG et al., 1990), camundongos (BLANK; DESJARDINS, 1985), hamsters (MORIN, 1986), ovinos (FOSTER; OLSTER, 1985), macacos (CAMERON; NOSBISCH, 1991) e humanos (RÖJDMARK, 1987; CAMERON et al., 1991). Por outro lado, a secreção pulsátil de LH pode ser normalizada em questão de horas, após a realimentação (CAMERON; NOSBISCH, 1991).

McShane e Keisler (1990) demonstraram que a administração de LH em cordeiras subnutridas induziu o crescimento folicular, o aparecimento de picos de LH de amplitude normal e a ovulação. Kurz et al. (1990) observaram que dietas com baixo nível de energia preveniram o aumento pré-puberal na freqüência de pulsos de LH em novilhas inteiras ou ovariectomizadas, tanto na presença quanto na ausência de estradiol. Os autores observaram também que o aumento no consumo de energia elevou a freqüência de pulsos de LH dentro de

14 dias, independente do status endócrino do animal. Foster et al. (1989), também trabalhando com cordeiras, demonstraram que a subnutrição deprime a secreção de LH, mas não afeta a secreção do hormônio de crescimento (GH) e da prolactina, e que cordeiras subnutridas e agonadais respondem normalmente a doses fisiológicas de GnRH. Tais observações sugerem que a função secretória da hipófise anterior não é comprometida como um todo pela subnutrição, de forma que os efeitos desta na secreção de LH parecem se manifestar em nível de sistema nervoso central.

Acredita-se que a supressão do LH induzida pelo jejum seja conseqüência da redução na liberação de GnRH no cérebro, uma vez que animais em jejum, quando recebendo GnRH exógeno, apresentam secreção de LH semelhante a animais bem alimentados (CAMERON; NOSBISCH, 1991; BRONSON, 1986; FOSTER et al., 1989; KILE et al., 1991; ALOI et al., 1997). Experimentos utilizando um estimulador da liberação de GnRH, o N-metil-d,1-aspartato, em cordeiras ovariectomizadas submetidas à restrição alimentar crônica, obtiveram sucesso na indução da liberação de LH (EBLING et al., 1990; I'ANSON et al., 1990). Além disso, o conteúdo hipotalâmico de GnRH foi semelhante em animais subnutridos e bem alimentados (EBLING et al., 1990), sugerindo que os efeitos da restrição alimentar ocorrem nos mecanismos centrais que controlam a secreção, mas não a biossíntese do GnRH.

O efeito da subnutrição no início da puberdade de novilhas parece ocorrer de forma semelhante ao observado em cordeiras. Em novilhas de corte, o anestro decorrente de uma nutrição deficiente está associado à redução da pulsatilidade do LH (RICHARDS et al., 1982), a qual se deve, aparentemente, ao aumento da responsividade do hipotálamo ao *feedback* negativo do estradiol, assim como a um efeito direto na secreção de GnRH, independente da presença de estrógenos (IMAKAWA et al., 1986a). Schillo et al. (1992) e Rawlings et al. (2003) observaram que a deficiência nutricional em novilhas de corte suprime os picos de secreção de GnRH no hipotálamo, atrasando a primeira ovulação. Greer et al. (1983), por sua vez, demonstraram a ocorrência de ovulação precoce, quando as novilhas foram submetidas a alto nível nutricional durante o crescimento. Day et al. (1986) não observaram aumento na freqüência de pulsos de LH em novilhas mantidas em dieta com baixos níveis de energia, com a aproximação da puberdade, enquanto que este aumento, seguido por ovulação, foi observado quando as novilhas receberam uma alimentação adequada para permitir seu crescimento normal. Além do efeito na freqüência dos pulsos de LH, os autores observaram redução na amplitude dos pulsos e na resposta hipofisária ao GnRH. No entanto, em estudo subseqüente, Kurz et al. (1990) demonstrou que a redução do nível energético da dieta aumentou a amplitude dos pulsos de LH e sua resposta ao GnRH , o

que está de acordo com a teoria de que a restrição energética reduz a freqüência de pulsos de GnRH, resultando em aumento na quantidade de LH armazenado na hipófise.

Em resumo, a supressão da liberação pulsátil de LH, provavelmente devido à inibição da secreção de GnRH pelo hipotálamo, é o mecanismo central pelo qual a restrição energética da dieta previne a ocorrência da puberdade (SCHILLO, 1992).

3.2.2 *Sinalização do status nutricional ao eixo reprodutivo*

Como citado acima, acredita-se que a influência da nutrição na secreção de LH ocorra através da modulação da secreção de GnRH no hipotálamo. No entanto, sabe-se muito pouco sobre como o animal informa seu status nutricional ao sistema nervoso central e sobre como esta informação é traduzida para sinais neuroendócrinos. Estudos prévios demonstraram a importância das reservas corporais de energia (tecido adiposo) na atividade reprodutiva e na secreção de LH (SCHILLO, 1992). Já está bem estabelecido que as reservas de tecido adiposo influenciam a capacidade reprodutiva de duas formas: na idade à primeira ovulação e na habilidade em manter a função reprodutiva durante a fase adulta.

Estudos documentaram o atraso na puberdade em dançarinas de ballet magras (FRISCH; McARTHUR, 1974; FRISCH et al., 1980) e o adiantamento da mesma em fêmeas obesas. Schneider e Wade (1989) observaram que o jejum agudo (dois dias) bloqueou o ciclo estral de hamsters magros, mas não teve efeito nos obesos. Segundo Foster et al. (1998), a restrição energética aguda e severa reduz rapidamente a secreção de LH em fêmeas monogástricas previamente bem alimentadas, sendo que, provavelmente devido à alta sensibilidade do cérebro às variações na disponibilidade de glicose, a reversão do quadro também ocorre rapidamente, após a realimentação. Em ruminantes previamente bem alimentados, por outro lado, o jejum agudo é menos deletério ao gerador de pulsos de GnRH e à secreção de gonadotrofinas. Animais cronicamente subnutridos e com depósitos de gordura praticamente esgotados, tanto monogástricos quanto ruminantes, entretanto, recuperam-se mais lentamente e a função reprodutiva só é restabelecida quando o animal atinge uma porcentagem mínima de gordura corporal (FRISCH et al., 1980; BRONSON, 1987). A forma como a taxa de crescimento, a idade e o PV alteram a sensibilidade do hipotálamo ao estradiol, indica que o tempo necessário para que a subnutrição bloqueie a atividade

reprodutiva relaciona-se intimamente com a quantidade dos depósitos de energia (gordura) corporais.

Várias teorias foram desenvolvidas na tentativa de explicar como o status nutricional influencia o desencadeamento da puberdade. A teoria do "peso crítico" diz que, quando o animal atinge um determinado PV mínimo, a puberdade é desencadeada (FRISCH; McARTHUR, 1974). Entretanto, desde a observação de que ratos subalimentados apresentavam atraso na puberdade, mas quando passavam a ter livre acesso ao alimento, apresentando rápido ganho de peso, atingiam a puberdade com PV menor que o considerado crítico para condições normais de alimentação (RONNEKLEIV et al., 1978), a teoria do "peso crítico" tem sido deixada de lado.

Em 1974, Frisch e McArthur propuseram, então, a hipótese de que uma quantidade mínima de gordura corporal seria necessária para a ocorrência normal da menarca nas adolescentes e da menstruação normal nas mulheres. De Souza e Metzger (1991) observaram que tanto a anorexia nervosa, quanto o treinamento físico intenso, estão associados à redução dos níveis de gonadotrofinas em humanos. Por outro lado, Frisch (1994) observou que adolescentes humanas normalmente diferem em altura e peso à menarca, mas tendem a apresentar porcentagem de gordura corporal semelhante e que mulheres sexualmente maduras, com baixa porcentagem de gordura corporal, são freqüentemente amenorréicas. A teoria da "porcentagem mínima de gordura", no entanto, ainda é controversa. Estudos realizados com ratos (GLASS et al., 1979; HANSEN et al., 1983; BRONSON, 1987) e novilhas (BROOKS et al., 1985) demonstraram que a puberdade não está relacionada com uma porcentagem constante de gordura corporal. Desta forma, é improvável que a gordura, por si só, seja o elo entre status nutricional e secreção de LH. O mais provável é que numerosos mecanismos estejam envolvidos e que alterações metabólicas decorrentes de alterações nutricionais, com conseqüente alteração na gordura corporal, regulem a liberação pulsátil de LH (SCHILLO, 1992).

Os sinais químicos ou hormonais ligando PV e adiposidade com a puberdade ainda não foram bem definidos, mas a existência de tais sinais já foi proposta há mais de três décadas (WILTBANK et al., 1966; FRISCH, 1984). Estudos iniciais demonstraram que sinais derivados da gordura, como ácidos graxos e estrógenos, assim como a glicose ligam adiposidade e sistema reprodutivo (FRISCH; RAVELLE, 1970; SMITH; FRISCH et al., 1975).

A relação entre nutrição e secreção de LH pode ocorrer através de sinais sangüíneos específicos, como metabólitos e hormônios metabólicos (STEINER et al., 1983), dos quais a

insulina, o GH e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) são exemplos. A insulina é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, influenciando várias funções do sistema nervoso central, além disso, em ruminantes, sua concentração periférica é diretamente proporcional ao consumo alimentar (GOLDEN et al., 1997; TARTAGLIA, 1997; BJØRBAEK et al., 1998). Segundo McCann e Hansel (1986), a redução na insulinemia está associada com uma redução na liberação de LH em ruminantes em restrição alimentar. Entretanto, Harrison e Randel (1986) demonstraram que a infusão sistemática de insulina em novilhas falhou em alterar a secreção de LH durante o ciclo estral. Em cordeiras ovariectomizadas, a infusão cerebroventricular a curto-prazo de insulina também falhou em elevar os níveis plasmáticos de LH durante a restrição alimentar, além de inibir a secreção de LH em cordeiras bem alimentadas, sugerindo que a insulina pode não ser o elo entre nutrição e secreção de LH (FOSTER; OLSTER, 1985).

O GH e o IGF-I possuem importante papel na regulação do metabolismo intermediário e a restrição do consumo alimentar em ruminantes eleva a concentração de GH (BRIER et al., 1986; FOSTER et al., 1989; THOMAS et al., 1990) e reduz a concentração de IGF-I circulante (BRIER et al., 1986; RUTTER et al., 1989). Entretanto, o tratamento a longo-prazo com GH recombinante durante o período pré-puberal não teve efeito na obtenção da puberdade, desenvolvimento folicular e padrão de secreção de LH em novilhas recebendo dois níveis de energia na dieta (McSHANE et al., 1989; HALL et al., 1990).

Recentemente tem sido postulado que um hormônio produzido pelo tecido adiposo, a leptina, sinalize a condição corporal ao hipotálamo, exercendo um efeito permissivo à obtenção da puberdade (SPICER, 2001). Existem diversas evidências de que a leptina seja o sinal metabólico que inibe a atividade reprodutiva em condições nutricionais deficientes e reservas energéticas inadequadas (CUNNINGHAM et al., 1999). Alguns autores afirmam que a leptina ativa mecanismos hipotalâmicos, aumentando o número de picos de secreção de LH (FOSTER; NAGATANI, 1999; GARCIA et al., 2002). Segundo Gallina et al. (2000), em baixas condições nutricionais, os níveis de leptina e gonadotrofinas estão relativamente baixos, sendo que a administração de leptina exógena normaliza as concentrações séricas de LH e do hormônio folículo estimulante (FSH).

3.3 Leptina

A regulação central do desenvolvimento físico e da reprodução está claramente associada aos depósitos periféricos de energia, sendo que a potencial ligação genética entre metabolismo de gordura e eixo reprodutivo é conhecida desde os anos 50, quando a linhagem de camundongos geneticamente obesos (*ob/ob*) foi primeiramente descrita. A partir de então, diversos estudos em animais e humanos indicaram que, provavelmente, tal associação ocorra através de mediadores neuro-humorais sinalizadores do consumo de energia e da quantidade de gordura armazenada ao sistema nervoso central (CLAYTON et al., 2000). A leptina, no entanto, foi apontada como um desses possíveis mediadores apenas a partir de 1994, quando Zhang et al. obtiveram sucesso na clonagem e seqüenciamento de seu gene codificador (gene ob) e identificaram a mutação responsável pela linhagem de camundongos *ob/ob*.

A leptina é um hormônio protéico de 16 kDa, composto por 146 aminoácidos e sintetizado primariamente por adipócitos. Após a clivagem do peptídeo sinalizador, composto por 21 aminoácidos, ela é secretada na corrente sangüínea e vai atuar na regulação do consumo alimentar, do eixo neuroendócrino e de processos imunológicos (ZHANG et al. 1994; HOUSEKNECHT; PORTOCARRERO, 1998; BARB, 1999). A leptina possui um potente efeito supressor do apetite, além de estimular o gasto de energia, e está sendo considerada como o elo entre nutrição, metabolismo e reprodução (MACIEL et al., 2004a). A observação de que o nível de leptina plasmática é proporcional ao teor de gordura corpórea, refletindo a quantidade de triglicerídeos acumulados no tecido adiposo (MAFFEI et al., 1995), também contribuiu para o desenvolvimento da teoria da ação da leptina como um sinal humoral indicador da quantidade de gordura corporal, ou seja, dos depósitos de energia do organismo.

O papel primário da leptina no organismo parece ser o de regulador do balanço energético do organismo. Sugere-se que níveis em elevação de leptina, conforme aumentam os depósitos de triglicerídios, sirvam de mecanismo de *feedback* negativo ao cérebro, resultando em redução na ingestão de alimentos, aumento no gasto energético, e resistência à obesidade. Além disso, a leptina circulante parece possuir um papel importante no eixo neuroendócrino (20), atuando também na regulação da reprodução.

Constante ganho de peso, alterações sazonais de fotoperíodo e concentração sangüínea de proteínas ligadoras são exemplos de variáveis que contribuem para o aumento da concentração sérica de leptina (MAFFEI et al., 1995; HOUSEKNECHT et al., 1996;

BOCQUIER et al., 1998;). A leptina é encontrada, na circulação, tanto na forma livre como ligada a proteínas carreadoras, característica que parece ser espécie-específica e dependente do status fisiológico (HOUSEKNECHT et al., 1996; GARCIA et al., 2002). A maior parte da leptina sérica circula associada a proteínas de ligação (carreadoras), sendo que deficiências no sistema de transporte e/ou na ligação com o transportador resultam em altos níveis de leptina na forma livre. Já foi relatada uma alta correlação entre proporção de leptina livre e quadros de obesidade em humanos. Observa-se que a forma ligada da leptina circulante é reduzida nos indivíduos obesos (SINHA et al., 1996) e em camundongas em final de gestação (GAVRILOVA et al., 1997), levando ao aumento da forma livre. A leptina livre não consegue atravessar a barreira hematoencefálica, resultando em um estado de hiperleptinemia e ao desenvolvimento de resistência à leptina.

3.3.1 *Modelo murino*

Os camundongos *ob/ob* são uma linhagem mutante, geneticamente obesa e de ocorrência natural, que apresenta uma mutação homozigótica no gene *ob*, resultando em deficiência na produção de leptina. Estes animais apresentam uma síndrome composta por hiperfagia, que resulta em rápido desenvolvimento de obesidade associada à hiperglicemia e resistência à insulina; além de intolerância ao frio e infertilidade (ZHANG et al. 1994).

Experimentos utilizando esta linhagem demonstraram que, em machos e fêmeas, a administração de leptina recombinante, tanto periférica quanto centralmente, reduz o consumo alimentar e o peso vivo (PV), restaura a fertilidade através do aumento na secreção de gonadotrofinas (LH na fêmea e FSH no macho) e, na fêmea, aumenta o número de folículos ovarianos primários e de Graaf (CHEHAB et al., 1996). Entretanto, apesar da considerável perda de peso vivo, após 14 dias de tratamento, houve aumento no peso dos órgãos reprodutivos (ovários, útero, testículos e vesícula seminal). Este efeito estimulatório nos órgãos reprodutivos parece ter relevância funcional, uma vez que os animais mutantes tratados foram capazes de reproduzir normalmente com animais normais, demonstrando que a perda de peso não é a responsável direta pelas alterações na capacidade reprodutiva (CAMPFIELD et al., 1995; HALAAS et al., 1995; PELLEYMOUNTER et al., 1995; BARASH et al., 1996; CHEHAB et al., 1996; MOUNZIH et al., 1997). Tais resultados

demonstram que a deficiência na produção de leptina provavelmente seja a causa da síndrome de obesidade e infertilidade descrita.

Entretanto, apesar de a relação entre a leptina e o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal já estar bem descrita para o modelo murino, ainda é relativamente pouco definida para espécies superiores (CLAYTON et al., 2000).

3.3.2 *Mecanismo de ação da leptina no sistema nervoso central*

O hipotálamo parece ser o principal local de ação da leptina, uma vez que possui grande número de receptores, principalmente nas áreas associadas com o controle do apetite, da reprodução e do crescimento (DYER et al., 1997; LIN et al., 2000). No entanto, outras áreas do cérebro e da hipófise também possuem receptores, representando alvos prováveis (LIN et al., 2000; BJØRBAEK; KAHN, 2004).

Os receptores de leptina (receptores OB) são proteínas monoméricas trans-membrana encontradas em seis isoformas, diferindo quanto ao tamanho do domínio intracelular, mas com domínios extracelulares idênticos. A forma longa (OB-rb) está presente em várias regiões do cérebro, principalmente nos núcleos arqueado, dorsomedial, ventromedial e paraventricular do hipotálamo, regiões chave no controle do apetite e do peso corporal. Foram observadas grandes quantidades de receptores OB-rb nos núcleos arqueado e ventromedial do hipotálamo e na hipófise anterior de porcos, ovelhas, ratos e camundongos (TARTAGLIA et al., 1995; DYER et al., 1997; ZAMORANO et al., 1997; LIN et al., 2001). No entanto, ele também pode ser encontrado, em pequena quantidade, em outras regiões do corpo, como pulmões, rins, fígado, tecido adiposo e células β do pâncreas (DeMATTEIS et al., 1998; MORTON et al., 1998). As quatro formas curtas (OB-ra; OB-rc; OB-rd; OB-rf) estão presentes nos demais tecidos (adiposo, gástrico, gônadas, placenta e etc). O OB-ra é a principal das formas curtas. É encontrado em pequena quantidade no hipotálamo, mas em grande quantidade nos micro-vasos cerebrais e no plexo coróide de ratos (BJØRBAEK et al., 1998), de forma que, muito provavelmente, está envolvido com o transporte da leptina através da barreira hemato-encefálica (TARTAGLIA, 1997; BJØRBAEK et al., 1998). Já o OB-rb, principal forma presente no hipotálamo, provavelmente media o efeito da leptina no consumo alimentar, peso vivo e metabolismo (HOSSNER, 1998; MÁCAJOVÁ et al., 2003).

Existe também uma forma solúvel (OB-re), que consiste no domínio extracelular do receptor OB (HOUSEKNECHT et al., 1996; TARTAGLIA, 1997) e é considerada uma das proteínas carreadoras da leptina no plasma (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). Ao se ligar com a leptina, o OB-re aumenta sua meia-vida plasmática, contribuindo para o desenvolvimento da resistência (MAAMRA et al., 2001). Acredita-se que este receptor também possua papel crítico no transporte da leptina pela barreira hemato-encefálica (GOLDEN et al., 1997).

Devido à homologia estrutural com o receptor de interleucina 6 (IL-6) e ao fato de apresentarem vias sinalizadoras comuns, os receptores de leptina são considerados membros da família dos receptores de citocina classe I. O OB-rb é a principal isoforma responsável pela transdução do sinal da leptina no hipotálamo (TARTAGLIA et al., 1995; TARTAGLIA, 1997) e, assim como os outros membros desta família, não possui atividade catalítica intrínseca e está constitutivamente ligados a uma proteína citossólica com atividade de tirosina quinase, a Janus-quinase (JAK).

Os receptores OB são ativados através de um processo de homodimerização, após a ligação com a leptina. A ligação OB-rb/leptina desencadeia a atividade catalítica da JAK, que se autofosforila em vários resíduos de tirosina, tornando-se ativa e ativando outra JAK, ligada ao segundo receptor (TARTAGLIA, 1997; HOUSEKNECHT; PORTOCARRERO, 1998). As duas JAK ativadas catalisam a fosforilação dos resíduos 985 e 1138 de tirosina do receptor OB-rb (MUNZBERG; MYERS, 2005), criando três sítios ativos (um na molécula JAK e dois nos resíduos fosforilados do receptor), que darão continuidade à sinalização. Ocorre, então, o recrutamento de moléculas da família de "transdutores de sinal e ativadores de transcrição" (STAT, principalmente a STAT-3), que são fosforiladas, dimerizam e translocam para o núcleo, conduzindo o sinal gerado pela leptina e determinando a transcrição dos genes codificadores de neurotransmissores específicos (BJØRBAEK et al., 2004). Os receptores de forma curta utilizam outro sistema de transdução, através da ativação da MAPK.

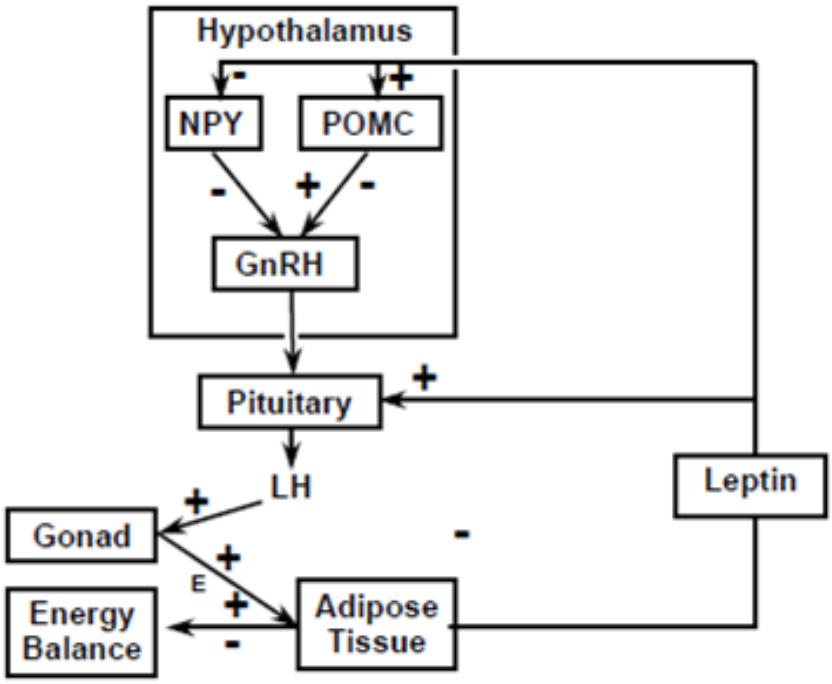
Concomitantemente à expressão dos neurotransmissores e neuropeptídeos no hipotálamo, a leptina induz a expressão da proteína SOCS-3, a qual inibe a sinalização OB-rb/JAK (STARR et al., 1997). Níveis elevados de SOCS-3 foram observados no hipotálamo de animais obesos e nos casos de resistência à leptina (BJØRBAEK et al., 1999; BANKS et al., 2000), e a administração de leptina, por sua vez, aumentou a expressão de RNAm de SOCS-3 no hipotálamo de camundongos *ob/ob* e outros mamíferos (BJØRBAEK et al., 1999; EYCKERMAN et al., 2002), de forma que o SOCS-3 pode ser considerado um provável mediador do desenvolvimento da resistência fisiológica à leptina (MASUHARA et al., 1997).

Sullivan e Meonter (2004) propuseram que o papel da leptina como sinal metabólico ligando o status energético ao eixo neuroendócrino, ocorreria por ação direta nos neurônios secretores de GnRH. No entanto, estudos com macacos Rhesus em jejum demonstraram baixa ou nenhuma expressão de RNAm de receptores OB nos neurônios hipotalâmicos produtores de GnRH (FINN et al., 1998), enquanto que sua expressão estava presente na hipófise de ovinos (DYER et al., 1997; IQBAL et al., 2000), suínos (LIN et al., 2000), camundogos (RABER et al., 1997; JIN et al., 2000) e ratos (MATSUDA et al., 1999; JIN et al., 2000;), sugerindo um efeito indireto da leptina no hipotálamo e um possível efeito direto na hipófise. O mais provável é que a ação da leptina na sinalização do status energético seja mediada por sistemas de neuropeptídeos hipotalâmicos comprovadamente envolvidos em diversas vias nervosas relacionadas com o controle do apetite, do peso corporal, de neurônios produtores de GnRH e do início da puberdade, como o neuropeptídeo Y (NPY), a pro-opiomelanocortina (POMC) e o ácido gama-aminobutírico (GABA), entre outros (CUNNINGHAM et al., 1999; IQBAL et al., 2001; WILLIAMS et al., 2002).

O NPY, um dos neuropeptídeos mais abundantes no hipotálamo, é um dos mais potentes fatores orexígenos, além de atuar no controle da secreção de GnRH e na termogênese (AHIMA et al., 1996; AUBERT et al., 1998; BARB, 1999; WILLIAMS et al., 2000). A localização de grande quantidade de RNAm de receptor OB em áreas com importante expressão do gene codificador do NPY, no hipotálamo, é evidência de que este neuropeptídeo representa um alvo em potencial para a leptina (CUNNINGHAM et al., 1999; IQBAL et al., 2001), a qual, uma vez transportada ao sistema nervoso central, interage com os receptores OB-rb nos corpos celulares dos neurônios produtores de NPY, no hipotálamo lateral (AHIMA et al., 1996).

O NPY possui efeitos divergentes, tanto ativando quanto inibindo a secreção de GnRH, dependendo de fatores como jejum ou alimentação *ad libitum,* administração aguda ou crônica e da idade do animal. Apesar de ser capaz de estimular agudamente a secreção de GnRH em animais bem nutridos, seu efeito mais marcante ocorre durante o estresse nutricional, tanto em monogástricos quanto em ruminantes (KALRA; CROWLEY, 1992; KALRA; KALRA, 1996). Em animais mal nutridos, que possuem pequena quantidade de tecido adiposo, a expressão da leptina é suprimida e o nível central de NPY está bastante aumentado, resultando em inibição da secreção hipotalâmica de GnRH e, conseqüentemente, na secreção hipofisária de LH, além de aumento no apetite (KALRA et al., 1999). Já em animais alimentados e bem nutridos, com maior reserva de tecido adiposo e altos níveis de leptina circulante, o nível de NPY no sistema nervoso central é menor, aumentando,

conseqüentemente, a secreção de GnRH e LH (Figura 1). Desta forma, observa-se que, enquanto a leptina age como um fator periférico de integração entre status nutritivo e função reprodutiva, o NPY atua como um fator central.



Fonte: Adaptado de Barb et al., 2004

Figura 1 - Envolvimento da leptina na regulação neuroendócrina da secreção de LH

A ativação do sistema NPY parece estar relacionada com alterações fisiológicas crônicas, como as que ocorrem durante o jejum e aplicação crônica de leptina (BARB et al., 2004) e sua atividade na regulação do apetite e da secreção de GnRH/LH foi relatada em roedores, primatas, ovinos, bovinos e suínos (KAYNARD et al., 1990; KALRA, 1993; THOMAS et al., 1999; BARB, 1999; MORRISON et al., 2003). Miner (1992), trabalhando com ovinos, e Barb et al. (2001a), trabalhando com suínos, demonstraram que a administração de NPY possui efeito estimulatório do apetite, sendo que, em suínos, tal efeito pode ser revertido pela administração central de leptina (BARB, 1999). A infusão de NPY também estimulou o consumo alimentar e inibiu a secreção de gonadotrofinas em ovinos e bovinos (GAZAL et al., 1998; THOMAS et al., 1999). Dyer et al. (1997) observaram que o tratamento de camundongos *ob/ob* com leptina exógena diminuiu a expressão do RNAm do NPY no

núcleo arqueado, restaurando a condição corporal e a função reprodutiva dos animais. Observa-se também que a expressão de receptores de NPY é menor em ovelhas em restrição alimentar, que em ovelhas com alimentação *ad libitum* (DYER et al., 1997).

Além do NPY, entretanto, existem outros neuropeptídeos que parecem estar envolvidos na mediação da ação da leptina no sistema nervoso central, como o CART (cocaine and amphetamine regulated transcript), por exemplo, um peptídeo inibidor do apetite. Experimentos *in vitro,* com explantes de hipotálamo retroquiasmático de ratas pré-púberes, contendo neurônios produtores de GnRH, demonstraram um efeito estimulatório da leptina sobre a expressão do CART, com conseqüente redução no intervalo entre os pulsos de GnRH (LEBRETHON et al., 1999). Observou-se, também, que os efeitos do NPY no intervalo dos pulsos de GnRH não foram afetados por anticorpos anti-CART, indicando que as vias leptina-CART são independentes do NPY e que provavelmente existam diversas vias ligando a leptina aos neurônios produtores de GnRH.

Neurônios hipotalâmicos que expressam a POMC possuem sinapse direta com neurônios produtores de GnRH (CUNNINGHAM et al., 1999) e são imunorreativos a anticorpos anti-OB-rb (IQBAL et al., 2001). A POMC, por sua vez, é precursora de substâncias como β-endorfina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio estimulador de melanócitos (α-MSH) e NPY (RIVIER; RIVEST, 1991), sendo que já foi demonstrado que a β-endorfina e o α-MSH modulam a secreção de gonadotrofinas e o consumo alimentar (BARB et al., 1991; MINER, 1992; VERGONI et al., 2000; SCHIOTH; WATANOBE, 2002). Em experimento realizado com camundongos *ob/ob,* Cunningham et al. (1999) demonstraram que o tratamento com leptina restaura a expressão do gene codificador da POMC.

3.3.3 *Relação entre leptina, nutrição e função reprodutiva*

As alterações do status nutricional e do PV alteram o perfil hormonal dos animais, influenciando diretamente o comportamento reprodutivo e atrasando a obtenção da puberdade (KENNEDY; MITRA, 1963; FOSTER; OLSTER, 1985; DICKERMAN et al., 1993; GILL; RISSMAN, 1997). Os hormônios e metabólitos que ligam nutrição e puberdade, assim como o mecanismo neuroendócrino pelo qual os neurônios produtores de GnRH são estimulados a aumentar sua atividade secretória, resultando na primeira ovulação, ainda não foram

totalmente elucidados (MACIEL et al., 2004a). Sabe-se que o início da puberdade é influenciado por fatores periféricos, através de sinais metabólicos (CAMERON et al., 1985; BARB et al., 1997), no entanto, devido ao grande número de substâncias originadas perifericamente que podem agir centralmente, modificando a atividade neuronal, a identificação de tais sinais é bastante difícil. Neste contexto, a descoberta da leptina, potente hormônio da saciedade sintetizado e secretado por adipócitos e altamente correlacionado com PV e adiposidade, representou um avanço no entendimento da relação entre tecido adiposo, homeostase energética e regulação central da reprodução (CAMPFIELD et al., 1995). Desde então, diversos experimentos vêm sendo realizados, demonstrando a relação entre leptina, nutrição e função reprodutiva.

Com a aproximação da puberdade, a concentração sérica de leptina aumenta linearmente em diversas espécies, como roedores (AHIMA et al., 1997; CHEHAB et al., 1997; QUINTON et al., 1999), humanos (GARCIA-MAYOR et al., 1997; MANTZOROS et al., 1997; KIESS et al., 1999;), suínos (QIAN et al., 1999) e bovinos (GARCIA et al., 2002). Em 2002, Garcia et al. observaram aumento na leptina sérica e na expressão de seu gene, coincidindo com um aumento na concentração sérica de IGF-I e no PV, durante o desenvolvimento da puberdade em novilhas. Em humanos, Matkovic et al. (1997) observaram uma relação inversa entre idade à menarca e concentração sérica de leptina, indicando que indivíduos com altos níveis do hormônio entravam em puberdade mais cedo. Da mesma forma, Vaiciunas (2007), trabalhando com novilhas zebuínas geneticamente precoces e não precoces, observaram que um dos mecanismos envolvidos na precocidade sexual, foi a maior expressão de leptina pelo tecido adiposo, além de menor expressão de receptores de NPY no hipotálamo. Por outro lado, crianças que apresentavam determinada mutação recessiva no gene da leptina, não produzindo o hormônio ou produzindo-o sem atividade biológica, não atingiam a maturidade sexual (KIESS et al., 1999).

Como descrito anteriormente, a concentração de leptina sérica é um reflexo direto da quantidade de tecido adiposo (reserva energética) e do consumo alimentar, sendo que a subnutrição determina o bloqueio do eixo reprodutivo. Já foi demonstrado, porém, que a administração exógena de leptina restaura a pulsatilidade da secreção de LH, permitindo a reativação do eixo reprodutivo e a ocorrência normal da puberdade. A partir de tais observações pôde-se relacionar a leptina com os processos fisiológicos de adaptação à restrição alimentar, que determinam o aumento do apetite e a redução da capacidade reprodutiva, protegendo a fêmea da concepção e das demandas energéticas da gestação.

A subnutrição é considerada um dos fatores primários associados com o aumento do número de receptores de leptina no hipotálamo ventromedial de ovelhas (DYER et al., 1997) e na hipófise e hipotálamo de ratos (ZAMORANO et al., 1997). Conclui-se, desta forma, que o jejum e a restrição energética crônica e severa sensibilizam o eixo hipotálamo-hipófise à ação da leptina, reduzindo a secreção hipofisária de LH (MACIEL et al., 2004a).

Camundongos normais submetidos à restrição alimentar, não apenas apresentaram baixos níveis de leptina sérica, como também um quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico, redução dos níveis de tiroxina e níveis elevados de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, indicando funcionamento anormal da hipófise. Nestes animais, entretanto, o quadro foi parcialmente revertido pela administração exógena de leptina, em dose suficiente para normalizar seus níveis séricos (AHIMA et al., 1996). A concentração sangüínea de LH aumentou, também, após a infusão de leptina periférica e intraventricular em primatas não-humanos (FINN et al., 1998) e vacas ovariectomizadas com implante de estradiol e em restrição alimentar (AMSTALDEN et al., 2002). Barb et al. (2004) observaram que o tratamento com leptina em explantes de cabras pré-púberes inteiras ou ovariectomizadas, em dieta de mantença, estimula a secreção basal de LH diretamente da hipófise anterior e a liberação de GnRH do núcleo pré-óptico do hipotálamo. Em ruminantes pré-púberes, a restrição alimentar aguda reduziu a expressão do gene da leptina e sua secreção pelo tecido adiposo, e aumentou a expressão hipotalâmica do receptor OB-rb (DYER et al., 1997; AMSTALDEN et al., 2000), ao mesmo tempo que reduziu a concentração sérica de insulina e IGF-I, e a freqüência de pulsos de LH (AMSTALDEN et al., 2000; MORRISON et al., 2001). Entretanto, ao contrário da novilha, o jejum agudo (2 a 3 dias) falhou em reduzir a pulsatilidade do LH na vaca madura (AMSTALDEN et al., 2002), sugerindo a existência de maior sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise de animais jovens às variações na disponibilidade de energia e sugerindo que, nestes, o nível crítico de leptina é atingido mais facilmente (WILLIAMS et al., 2002). Além disso, esta ausência de efeito da restrição alimentar, observada em vacas maduras previamente bem alimentadas, pode resultar da quantidade de gordura acumulada antes do período de jejum e do fato de a fermentação ruminal ainda continuar a ocorrer por um período relativamente longo após a última refeição.

É importante salientar que, embora a leptina possa participar da sinalização do status metabólico ao sistema nervoso central, a resposta neuroendócrina à restrição energética aguda parece depender da espécie animal estudada (BARB et al., 2004). Experimentos realizados com suínos demonstraram que o jejum agudo, de aproximadamente 28 horas, reduz a secreção de leptina pelo tecido adiposo, mas não afeta a secreção de LH pela hipófise (BARB et al.,

2001b). Acredita-se que a habilidade dos suínos em manter um estado de euglicemia durante o jejum agudo, possa contribuir para esta ausência de efeito sobre a secreção de LH (BARB et al., 1997).

A habilidade da leptina aplicada perifericamente em novilhas com idade próxima à prevista para a ocorrência natural da puberdade, em prevenir a redução na freqüência de pulsos de LH devido ao jejum, decorre de sua habilidade em modular a atividade do gerador de pulsos de GnRH neste modelo animal (MACIEL et al., 2004b). Tal afirmação está de acordo com outros trabalhos publicados em roedores (AHIMA et al., 1997), macacos (FINN et al., 1998) e carneiros com implante de estradiol (NAGATANI et al., 2000), e sugerem que a leptina tenha um importante papel como elo entre status nutricional e eixo reprodutivo central em bovinos (GARCIA et al., 2002). Entretanto, a ação central da leptina na secreção hormonal depende inteiramente da condição nutricional do animal, uma vez que tanto sua expressão quanto sua concentração sangüínea são altamente responsíveis ao fluxo de nutrientes.

Diversos experimentos realizados com ovinos e bovinos demonstram que a leptina estimula a secreção de LH apenas em situações de estresse nutricional (NAGATANI et al., 2000; HENRY et al., 2001; AMSTALDEN et al., 2002, 2003). Henry et al. (1999) verificaram que a administração intraventricular crônica de leptina estimula a secreção de LH em ovelhas ovariectomizadas em restrição alimentar, mas não tem efeito em ovelhas bem nutridas com reposição de esteróides. Morrison et al. (2002), por sua vez, observaram que a administração de leptina não afetou a secreção de nenhum hormônio, incluindo LH e GH, em cordeiras bem alimentadas.

3.3.4 *Papel da leptina na obtenção da puberdade*

Sabe-se que o desenvolvimento da puberdade não é resultado simplesmente da idade cronológica, mas até certo ponto, pode ser influenciado por fatores internos e externos, como taxa de crescimento, composição corporal (adiposidade), estresse, consumo de energia, alterações anuais no fotoperíodo, ritmo circadiano, esteróides gonadais, gasto energético e sinais olfativos (EBLING, 2005). Não é surpresa, portanto, que um grande número de substâncias participem da sinalização de todas essas informações aos neurônios secretores de GnRH.

Há muito a relação entre quantidade de tecido adiposo e maturação sexual é conhecida. Um estudo realizado em adolescentes, entre 1980 e 1997, nos EUA, demonstrou uma tendência de redução na idade média à menarca no ano de 1997 em relação a 1980, o que estava associado com a maior incidência de sobrepeso na adolescência em 1997 (HERMAN-GIDDENS et al., 1997). Por outro lado, já havia sido demonstrado que os camundongos *ob/ob*, apesar de extremamente obesos, não entravam em puberdade (BRATT et al., 1982), indicando que a porcentagem de gordura corporal, por si só, não é o fator desencadeante da puberdade. A observação de que a administração de leptina estimulava o desenvolvimento reprodutivo destes camundongos (FOSTER; NAGATANI, 1999) e aumentava a secreção de gonadotrofinas em crianças congenitamente obesas, que não produziam leptina endógena (FAROOQI et al., 1999), indicou o possível papel da leptina como um "portão metabólico" para a ocorrência da puberdade. Em estudo realizado com novilhas, Garcia et al. (2002) demonstraram que a maior parte da variação na idade à puberdade encontrada, podia ser explicada pela variação no PV, e que este apresentava alta correlação positiva (R=0,85) com a concentração sérica de leptina. Os autores observaram, também, que a leptina sérica aumentou linearmente a partir da 16ª semana anterior até a semana da primeira ovulação.

O consumo moderado de energia, associado à restrição do crescimento, pode atrasar a puberdade através da prevenção do aumento na freqüência de pulsos de LH, devido, em parte, ao aumento na sensibilidade do hipotálamo ao *feedback* negativo do estradiol e conseqüente falha na sinalização do GnRH (KINDER et al., 1987). Este complexo sistema de comunicação neuro-humoral é profundamente afetado pelo consumo de energia e pelo metabolismo, tanto antes quanto após a maturação sexual. O papel da leptina, especificamente, no início da puberdade, quando o gerador de pulsos de GnRH está sendo reativado, ainda não está bem esclarecido (CLAYTON et al., 2000) e, apesar de existirem várias evidências de que a leptina esteja de fato fisiologicamente envolvida com a maturação do eixo reprodutivo, ainda há muita discussão sobre se ela age como um "gatilho" ou apenas um sinal permissivo ao desenvolvimento da puberdade.

Inicialmente, a observação de que o tratamento com leptina adiantava a puberdade em camundongas normais pré-púberes (CHEHAB et al., 1997), levou ao conceito de que a leptina seria um gatilho, sinalizando ao sistema nervoso central a existência de depósitos de energia adequados para o início do dispendioso processo reprodutivo. Entretanto, estudos subseqüentes falharam em repetir tais resultados, demonstrando que a leptina não adiantava a puberdade em camundongas bem nutridas (CHEUNG et al., 2001), mas apenas prevenia o atraso da puberdade em camundongas e ratas subnutridas, com reservas deficientes de energia

(AHIMA et al., 1996; CHEUNG et al., 1997). Analisados em conjunto, os dados fornecem a base para a afirmação de que leptina possui apenas um papel permissivo à ocorrência da puberdade, ao invés de funcionar como um gatilho propriamente dito. Em outras palavras, conforme aumenta a concentração de leptina circulante, durante o desenvolvimento puberal normal ou devido à administração exógena, atinge-se um limiar que permite a ativação do eixo reprodutivo. Entretanto, os resultados obtidos a partir de diversos experimentos ainda são conflitantes. Ahima et al. (1997) e Chehab et al. (1997) observaram que a administração intraperitoneal de leptina em doses suficientes para reduzir o apetite e o PV, ou em dose menor, que não apresente efeito na redução do PV, adiantou a ocorrência da puberdade em camundongas normais pré-púberes. Quando o mesmo tratamento foi aplicado em ratas pré-púberes, no entanto, não foi observado efeito algum quando as ratas eram bem alimentadas, mas apenas quando os animais foram mantidos em jejum (CHEUNG et al., 1997; AUBERT et al., 1998). Já Barash et al. (1996) afirmam que o tratamento com leptina adianta a maturação sexual de animais tanto em restrição alimentar quanto alimentados *ad libitum.*

Há outros fatores, além da leptina, envolvidos na regulação do início da puberdade. Alguns autores afirmam que o estradiol modula a resposta hipotálamo-hipofisária à leptina, regulando as alterações na expressão do gene *ob*, observadas na puberdade (BARB et al., 2004). Experimentos utilizando cabritas pré-púberes demonstraram que a expressão de RNAm de leptina no tecido adiposo, induzida pelo estrógeno, ocorreu no tempo esperado de puberdade, mas não em animais mais jovens (QIAN et al., 1999), o que estava associado com uma elevação na secreção de LH e uma elevação na expressão de receptores OB-rb no hipotálamo, dependente da idade (LIN et al., 2001).

3.4 Função Ovariana

O ciclo estral dos bovinos dura cerca de 21 a 22 dias e apresenta um padrão de ondas, que varia de uma a quatro por ciclo, sendo que o padrão em três ondas é o mais freqüentemente observado (GINTHER et al., 1989). Cada onda folicular dura uma média de 7 a 10 dias e passa por fazes de emergência, seleção, divergência, dominância e atresia/ovulação. De uma forma geral o ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, envolvendo principalmente hormônios hipotalâmicos, gonadotrofinas e esteróides gonadais, sendo que o crescimento folicular envolve a proliferação e a

diferenciação, induzidas hormonalmente, das células da granulosa e da teca, aumentando gradativamente a capacidade do folículo de produzir estradiol e responder às gonadotrofinas. A produção de estradiol, por sua vez, é o fator que determina qual folículo obterá um número suficiente de receptores de LH para a ovulação e luteinização (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os primeiros folículos antrais aparecem no período pré-púbere na porca e na coelha, ou até mais cedo, na vaca e na ovelha, porém o desenvolvimento folicular completo só é observado quando o FSH e o LH alcançam perfis adultos (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A emergência de um onda folicular é estimulada pelo aumento transitório (de 1 a 2 dias) na concentração sérica do FSH, que ocorre tanto em vacas cíclicas (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1997) quanto em vacas em anestro (STAGG et al., 1998). Após alcançar um pico, a concentração de FSH declina por vários dias, ao mesmo tempo em que os folículos crescem, passando de aproximadamente 4,0 mm para cerca de 8,5 mm de diâmetro (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1997). Diversos folículos são recrutados no início de cada onda, crescendo de forma semelhante até o momento da divergência, quando surge um único folículo dominante, que se diferencia dos demais folículos subordinados. O momento da divergência folicular é definido como o momento em que a diferença de diâmetro entre os dois maiores folículos aumenta (GINTHER et al., 1997), o que tipicamente ocorre quando o maior folículo alcança 8,5 mm de diâmetro (GINTHER et al., 1997; GINTHER et al., 1998; GINTHER et al., 1999; KULICK et al., 1999; GINTHER et al., 2001).

A partir da divergência, um estado de dominância funcional é estabelecido, no qual o folículo dominante (FD) continua a crescer, enquanto os subordinados cessam seu crescimento e começam a regredir. Além do substancial aumento no tamanho, o FD se diferencia dos subordinados pela maior capacidade de produzir estradiol (GINTHER et al., 1997; AUSTIN et al., 2001) e pelo aumento na concentração intrafolicular de IGF-I (GINTHER et al., 2001). Os folículos subordinados, então, perdem a capacidade de secretar estradiol, param de crescem e começam a diminuir de tamanho, tornando-se atrésicos. Durante a atresia folicular observa-se, também, uma redução nos sítios de ligação de gonadotrofinas (IRELAND; ROCHE, 1983a, b) e o início do processo de apoptose das células da granulosa.

A partir da seleção, durante a redução da concentração de FSH, o FD mantém um nível constante de secreção do hormônio até sua ovulação ou eventual atresia, dependendo do padrão de secreção de LH. Nos estágios finais do processo de seleção ocorre uma alteração e o FD, que inicialmente dependia de FSH para seu crescimento, passa a expressar apenas receptores de LH nas membranas das células da granulosa, de forma que a continuação do

crescimento e da secreção folicular de estradiol se tornam dependentes do aumento na freqüência dos pulsos de LH (SIROIS; FORTUNE, 1990; STOCK; FORTUNE, 1993; DISKIN et al., 2003). A ovulação ocorrerá, então, se houver um folículo maduro e quando o nível crescente de estradiol, secretado pelo FD, associado ao nível decrescente de progesterona, acionar o pico de secreção de LH.

Após a ovulação as células do folículo ovulatório sofrem um processo de luteinização, formando um corpo lúteo (CL), que irá secretar progesterona iniciando a fase luteínica do ciclo estral, que em vacas e porcas dura de 16 a 17 dias (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A progesterona secretada pelo CL prepara o útero para uma possível gestação. Caso a gestação não ocorra, a secreção uterina de prostaglandina $F_{2\alpha}$ inicia o processo de luteólise, determinando a regressão do CL e o início de nova fase folicular.

3.4.1 *Efeito da nutrição no desenvolvimento folicular*

A literatura sobre o efeito da nutrição no desenvolvimento folicular de bovinos é relativamente escassa, mas o hipotálamo (através da síntese e liberação de GnRH), a hipófise anterior (através da síntese e liberação de FSH, LH e GH) e os ovários (através da regulação do crescimento folicular e da síntese de esteróides) representam potenciais locais de ação. Estudos sugerem que os mecanismos que levam à falha na ovulação podem operar de forma diferente nestes diferentes pontos, dependendo da duração e da severidade da restrição alimentar (DISKIN et al., 2003).

Durante a restrição alimentar aguda, Mackey et al. (1999) demonstraram que a falha ovulatória estava associada com a ausência do pico pré-ovulatório de LH e FSH, fato este que poderia ser mediado por alterações no funcionamento tanto do hipotálamo quanto da hipófise, no entanto, o aumento na concentração de estradiol que determina o comportamento de cio estava mantido. Já na restrição alimentar crônica, a falha na ovulação e a ausência dos picos de FSH e LH foram acompanhadas por ausência do aumento na secreção de estradiol, indicando que, neste caso, provavelmente não houve pulsos suficientes de LH para induzir a produção do estradiol. Desta forma, os autores concluíram que a falta do *feedback* positivo permitiu que as baixas concentrações de estradiol impedissem o aumento da pulsatilidade do GnRH no hipotálamo, característico da fase do ciclo estral.

Murphy et al. (1991), estudando novilhas de corte alimentadas com 0,7, 1,1 ou 1,8% PV/dia, com base na MS, observaram uma redução no diâmetro máximo e na persistência do FD nos animais em restrição alimentar, apesar de a ovulação ter se mantido. Trabalhos subseqüentes obtiveram resultados semelhantes, com redução da taxa de crescimento, diâmetro máximo e persistência do FD, até a ocorrência de anestro nutricional (RHODES et al., 1995; BOSSIS et al., 1999; STAGG, 2000). Lucy et al. (1991) também observaram relação entre balanço energético negativo e redução do diâmetro folicular máximo em vacas de leite no pós-parto.

Já foi sugerida a existência de efeitos diretos da nutrição na função ovariana, no entanto, a comprovação de tal afirmação é dificultada, uma vez que o efeito da redução do consumo de nutrientes na redução da secreção de LH gera confundimento (RONNEKLEIV et al., 1978; FITZGERALD, 1984).

Trabalhando nesse sentido, McShane e Keisler (1991) avaliaram cordeiras cronologicamente imaturas recebendo alimentação normal ou restrita, e tratadas ou não com injeções de LH, de forma a simular o padrão de secreção endógeno que resultaria no pico pré-ovulatório de LH em ovelhas adultas. Os autores observaram que os ovários das cordeiras de ambos os grupos foram capazes de responder ao LH com aumento na secreção de 17β-estradiol, o qual provocou o pico de LH e determinou a ovulação. Entretanto a resposta dos animais em restrição alimentar ocorreu com cerca de 13 horas de atraso. A restrição alimentar, dessa forma, apesar de não impedir que os ovários respondessem ao LH, alterou a qualidade dessa resposta, indicando que a nutrição é capaz de atuar nos dois níveis de controle da reprodução, central e periférico.

3.4.2 *Efeito periférico da leptina na função ovariana*

Diversos experimentos demonstram que a leptina regula o desenvolvimento da puberdade através de ação central no hipotálamo, e não por ação periférica nas gônadas (CASANUEVA; DIEGUEZ, 1999), no entanto existem evidências de que haja também algum efeito endócrino periférico, diretamente na função ovariana, assim como nos oócitos e no desenvolvimento embrionário pré-implantação de mamíferos.

Observa-se que os tecidos gonadais possuem todas as isoformas do receptor OB (SPICER; FRANCISCO, 1997; 1998). Já foram identificados receptores de leptina nas células

da granulosa e da teca, nas células do cumulus oophorus, no oócito e no embrião. Além disso, a presença de leptina já foi descrita, também, nos fluidos folicular e uterino, provando sua disponibilidade para atuação nos folículos ovarianos e oócitos, assim como nos embriões pré-implantação (CIOFFI et al., 1997; KARLSSON et al., 1997; AGARWAL et al., 1999; BARKAN et al., 1999; BARROSO et al., 1999; BUTZOW et al., 1999; RYAN et al., 2002).

Uma série de hormônios metabólicos, como GH, insulina, IGF-I e inclusive a leptina parecem representar papéis importantes no controle do desenvolvimento folicular, provavelmente mediando o efeito do consumo alimentar e do balanço energético na reprodução e fertilidade das vacas. Diversos experimentos *in vitro*, utilizando cultura de células, demonstraram um efeito direto da leptina nas células da granulosa (SPICER; FRANCISCO, 1997; KARLSSON et al., 1997; ZACHOW; MAGOFFIN, 1997; AGARWAL et al., 1999; ZACHOW et al., 1999), o que pode estar envolvido na regulação do tamanho dos folículos e na qualidade dos oócitos (BOLAND et al., 2001). Entretanto, ao contrário do efeito estimulatório central, o efeito periférico da leptina parece ser inibitório da síntese de esteróides. Vários autores demonstraram que a leptina atenua a esteroidogênese induzida por gonadotrofinas e fatores de crescimento, tanto em células da teca (SPICER; FRANCISCO, 1998; AGARWAL et al., 1999) quanto em células da granulosa isoladas (SPICER; FRANCISCO, 1997; ZACHOW; MAGOFFIN, 1997; AGARWAL et al., 1999; BRANNIAN et al., 1999). Karlsson et al. (1997) demonstraram que a leptina suprime a síntese ovariana de estradiol e progesterona *in vitro.* Em ovários bovinos, foi observado um antagonismo direto da leptina sobre o efeito estimulatório da insulina na esteroidogênese das células da granulosa (SPICER; FRANCISCO, 1998), sendo que, na ausência de insulina, a leptina apresentou pouco ou nenhum efeito. Por outro lado, Ruiz-Cortez et al. (2003) relataram um efeito bifásico da leptina em células da granulosa de suínos, nas quais níveis fisiológicos do hormônio estimularam a esteroidogênese, enquanto níveis mais altos a inibiram.

Ainda não se sabe por que a leptina exerce efeito positivo na reprodução e na função ovariana de camundongos *ob/ob*, mas exerce efeitos negativos na esteroidogênese ovariana *in vitro* (SPICER, 2001). Talvez este fato ocorra devido à existência, *in vivo,* de múltiplos sítios de ação da leptina no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e da maioria dos estudos terem utilizados culturas de células isoladas, em condições totalmente diferentes das condições fisiológicas no ambiente ovariano (SWAIN et al., 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local, Instalações e Animais

O presente experimento foi realizado no Confinamento Experimental da Coordenadoria do *campus* Administrativo de Pirassununga, na Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

Trinta e seis novilhas pré-púberes da raça Nelore, selecionadas através de pesagens, avaliação do escore de condição corporal e avaliação ultrassonográfica da condição ovariana (ausência de corpo lúteo), foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais, com 12 animais cada, de acordo com a dieta oferecida e com o tratamento hormonal aplicado: A) dieta de alta densidade energética; B) dieta de baixa densidade energética; BL) dieta de baixa densidade energética com aplicação subcutânea de leptina recombinante ovina (oLeptina). No início do experimento os animais apresentavam de 18 a 20 meses de idade, peso vivo médio (PV) de 276,1 ± 17,9 kg e escore de condição corporal médio (ECC) de 4,7 ± 0,46, em escala de 1 a 9, onde 1 representa um animal muito magro e 9 representa um animal obeso.

As novilhas foram alojadas em duas baias coletivas, sob condições ambientais de luz e temperatura, de acordo com a dieta oferecida, de modo que o grupo A ocupou uma baia e os grupos B e BL ocuparam, juntos, a outra baia.

4.2 Dietas

As dietas foram formuladas e balanceadas, segundo o NRC (1996), para atender às exigências de mantença e promover um ganho de peso vivo médio diário (GMD) de 0,3 kg PV/dia, nos grupos recebendo dieta de baixa energia (B e BL), e 1,0 kg PV/dia no grupo recebendo dieta de alta energia (A).

A dieta de alta energia era composta por silagem de milho, como volumoso, e concentrado à base de farelo de soja, milho moído, calcário e suplemento mineral para bovinos de corte (Agromix SuperCria®), e apresentou relação volumoso:concentrado de 57:43

com base na MS. A dieta de baixa energia, por sua vez, era composta por bagaço de cana *in natura* (utilizado para limitar a ingestão de energia) e silagem de milho, como volumosos, e concentrado à base de farelo de soja, uréia, calcário e suplemento mineral para bovinos de corte (Agromix SuperCria®), e apresentou relação volumoso:concentrado de 88:12 com base na MS

As dietas foram fornecidas *ad libitum* na forma de ração total, uma vez ao dia, às 7:00 horas, em cochos adequados de alvenaria e com pelo menos 70 cm lineares por cabeça, dando acesso a todos os animais ao mesmo tempo e reduzindo a competição individual pelo alimento. O controle de consumo foi realizado em grupo através da pesagem diária das sobras e manutenção destas entre 5 e 10% do total oferecido. As dietas foram ajustadas semanalmente de acordo com o teor de matéria seca (MS) da silagem de milho e do bagaço de cana. As novilhas foram pesadas e o ECC foi avaliado duas vezes por semana, para acompanhamento do GMD. Amostras das sobras e dos ingredientes da dieta foram coletadas semanalmente e armazenadas em freezer a -20°C para posterior análise da composição bromatológica.

A composição bromatológica dos ingredientes e das dietas, assim como a proporção dos ingredientes nas dietas experimentais encontram-se nas tabelas 1 e 2.

As análises de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM) e lignina foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002), sendo que o teor de proteína bruta (PB) foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total, obtido pelo método micro Kjeldahl, por 6,25. Os teores de fibra em detergente neutro livre de cinzas (FDNc) foram obtidos em sistema extrator de fibra Ankon®, segundo metodologia descrita por Van Soest et al. (1991), utilizando α-amilase termo-estável e uréia, seguido por queima em mufla a 500°C. Os teores de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) foram obtidos *in vivo*, utilizando saquinhos de tecido não-tecido (TNT), incubados por 264 horas no rúmen de duas vacas Holandesas fistuladas e adaptadas, segundo metodologia detalhada mais à frente. Os carboidratos não fibrosos livre de cinzas (CNFc) foram calculados pela fórmula: CNFc = 100 – (FDNc + MM + EE + PB). Os valores de energia bruta (EB) foram obtidos diretamente em bomba calorimétrica e os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados segundo equações do NRC (2001), em que: NDT = CNFd + PBd + (AGd * 2,25) + FDNd – 7, onde PBd, CNFd, AGd e FDNd representam o total destes nutrientes digestíveis.

Tabela 1 - Teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro livre de cinzas (FDNc), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), lignina (LIG), carboidratos não fibrosos livre de cinzas (CNFc), carboidratos totais (CHO), matéria mineral (MM), nutrientes digestíveis totais (NDT), energia bruta (EB) e energia líquida de ganho (ELg) das dietas experimentais

Itens	Bagaço de cana *in natura*	Silagem de milho	Milho moído	Farelo de soja
MS[1]	57,27	36,75	88,15	88,76
MO[2]	93,16	94,50	98,66	93,19
PB[2]	1,69	7,51	10,08	53,36
EE[2]	0,50	3,84	4,33	1,69
FDNc[2]	86,41	45,08	11,37	13,83
FDNi[2]	54,29	21,74	3,10	2,02
LIG[2]	9,15	2,15	0,40	1,96
CNFc[2]	4.56	38,06	72,87	24,31
CHO[2]	90,97	83,14	84,25	38,14
MM[2]	6,84	5,50	1,34	6,81
NDT[3*]	43,89	69,52	77,34	89,13
EB[4] (cal/g MS)	4209,29	4244,93	4409,24	4744,31

[1] % matéria natural; [2] % matéria seca; [3] Estimado pelas equações do NRC (2001); [4] Obtido em bomba calorimétrica
[*] Para o cálculo de NDT foram utilizados os valores de NIDA e NIDN da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos para Bovinos (Valadares Filho et al., 2006).

Tabela 2 - Composição percentual dos ingredientes e teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro livre de cinzas (FDNc), fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), lignina (LIG), carboidratos não fibrosos livre de cinzas (CNFc), carboidratos totais (CHO), matéria mineral (MM), nutrientes digestíveis totais (NDT), energia bruta (EB) e energia líquida de ganho (ELg) das dietas experimentais

	Dietas Experimentais	
Ingredientes (%MS)	A[1]	B[2]
Bagaço de cana *in natura*	-	37,40
Silagem de milho	56,63	50,44
Milho moído	25,97	-
Farelo de soja	16,34	10,38
Uréia pecuária	-	0,93
Calcáreo	0,72	0,41
Mistura mineral[3]	0,34	0,41
Composição bromatológica		
MS[4]	59,27	50,89
MO[5]	94,40	93,16
PB[5]	15,59	12,57
EE[5]	3,59	2,30
FDNc[5]	30,74	57,11
FDNi[5]	13,44	31,48
LIG[5]	1,64	4,71
CNFc[5]	44,50	23,43
CHO[5]	75,19	79,93
MM[5]	5,59	6,81
NDT[6]	75,15	59,51
EB[7] (cal/g MS)	4323,91	4208,05

[1] Dieta de alta densidade energética; [2] Dieta de baixa densidade energética; [3] Mistura mineral para bovinos de corte Agromix SuperCria® (composição básica por quilograma do produto: fósforo – 85 g, cálcio – 130 g, magnésio – 5 g, enxofre – 25 g, sódio – 156 g, cloro – 240 g, zinco – 5000 mg, cobre – 1500 mg, ferro – 1700 mg, manganês – 1250 mg, cobalto – 120 mg, selênio – 15 mg, flúor – máximo de 850 mg); [4] % matéria natural; [5] % matéria seca; [6] Estimado pelas equações do NRC (2001); [7] Obtido em bomba calorimétrica.
[*] Para o cálculo de NDT foram utilizados os valores de NIDA e NIDN da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos para Bovinos (Valadares Filho et al., 2006).

4.3 Tratamento Hormonal

Após 14 dias de adaptação às instalações e às dietas, iniciou-se o tratamento hormonal com leptina recombinante ovina altamente purificada (oLeptina – Protein Rehovolt, Israel),. As novilhas do grupo BL receberam 4,8 µg oLeptina/kg PV via subcutânea, duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas entre as aplicações (às 6:00 e às 18:00 horas), por 56 dias. O esquema de aplicação visou elevar a concentração plasmática de leptina para valores acima de 5 ng/ml por cerca de 8 a 12 horas (MACIEL et al., 2004a). O volume aplicado foi aproximadamente 2 ml, com pequena variação de acordo com o PV. De forma semelhante, os grupos A e B receberam 2 ml de solução salina subcutânea.

A solução de oLeptina foi preparada a cada três dias, através da diluição do hormônio liofilizado em volume adequado de solução salina estéril, sendo armazenada sob refrigeração até o momento da aplicação.

Para a determinação do momento aproximado da primeira ovulação e, portanto, da obtenção da puberdade, foi realizada ultrassonografia transretal linear em tempo real, duas vezes por semana (às segundas e às quintas-feiras), com aparelho Aloka SSD-500V e transdutor de 7,5 MHz, até que todas as novilhas tivessem ovulado. Foram avaliados a presença de corpo lúteo (CL) e o diâmetro médio máximo do folículo dominante de cada ovário. Segundo Fortune et al. (1988) e Knopf et al. (1989), a ultrassonografia é um método confiável para a medição de folículos de diâmetro maior ou igual a 3 mm e para acompanhamento das alterações subseqüentes, relacionadas com o desenvolvimento de folículos individuais.

Amostras de sangue (10 ml) foram coletadas por punção da veia jugular, em tubos Vacutainer® secos, duas vezes por semana, simultaneamente à avaliação ultrassonográfica, para dosagem da concentração de progesterona no soro e confirmação da ovulação. A ocorrência de ciclos estrais curtos, com menos de sete dias de duração e com corpos lúteos de vida curta, são comuns quando as novilhas estão começando a ovular, tanto em animais *Bos taurus taurus* quanto em animais *Bos taurus indicus* (EVANS et al., 1994), de forma que optou-se pela coleta mais freqüente de sangue, impedindo que a ocorrência de ovulações em ciclos curtos passassem despercebidas. Após a coleta, o sangue foi imediatamente armazenado em isopor com gelo e levado ao laboratório, onde foi centrifugado a 1500 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C, em no máximo duas horas após a coleta, de modo

a minimizar a degradação dos hormônios. O soro foi transferido para tubos Eppendorff® de 1,5ml e armazenado em freezer a -20°C, até a realização das dosagens hormonais.

A dosagem de progesterona foi realizada no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Utilizou-se o método de radioimunoensaio (RIA) em fase sólida com reagentes comerciais (kits Coat-A-Count para determinação direta de progesterona, Siemens). Para o presente experimento, a idade à puberdade foi considerada como a idade à primeira detecção de um corpo lúteo por ultrassonografia transretal, confirmado como sendo funcional por concentração de progesterona sanguínea maior que 1 ng/ml (OYEDIPE et al., 1986).

4.4 Estimativa de Consumo

O consumo individual das novilhas alimentadas em grupo foi estimado a partir da administração do indicador externo óxido crômico e da determinação do indicador interno fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). Enquanto o primeiro foi utilizado para estimar a produção de MS fecal total (MSF), o segundo foi utilizado para estimar a digestibilidade aparente total da dieta.

Foram pesados 12 g de óxido crômico/animal/dia, os quais foram acondicionados em saquinhos de papel e oferecidos via oral por ingestão forçada, uma vez ao dia, no momento da aplicação do hormônio/solução salina, às 6:00 horas. Os saquinhos foram colocados diretamente na glote do animal, de modo a ser imediatamente deglutidos, evitando regurgitação e mastigação dos mesmos. Os animais receberam o marcador por 10 dias consecutivos, no meio do período de tratamento hormonal, dos quais os primeiros cinco dias representaram o período de adaptação e os últimos cinco dias representaram o período de coleta de amostras (fezes, sobras e ingredientes da dieta). As fezes foram coletadas diretamente do reto, duas vezes ao dia, no momento da administração do marcador (6:00 horas) e no final da tarde (18:00 horas). As amostras de fezes, sobras e ingredientes foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a -20°C até análise.

A dosagem do cromo nas fezes foi realizada em amostras compostas dos cinco dias de coleta de cada animal, segundo método colorimétrico adaptado de Savastano (1993), através da digestão nitroperclórica do cromo nas amostras.

As amostras de fezes foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 60°C por 72 horas e moídas em moinho de facas com a utilização de peneira de 1 mm. Foram pesados 250 mg de amostra, em duplicatas, em tubos de vidro micro Kjeldahl, aos quais foram adicionados 10 gotas de ácido sulfúrico PA, 5 ml de ácido nítrico PA e 3 ml de ácido perclórico 70%, nesta ordem. Os tubos foram acondicionados em bloco digestor a 100°C, sendo que a temperatura foi elevada de 50 em 50°C, a cada 10 a 15 minutos, até alcançar 300°C, até digestão completa das amostras, ou seja, até que a coloração passasse de marrom para amarela. Após a digestão, as amostras foram diluídas em balão volumétrico de 100 ml, com água destilada.

A reação colorimétrica foi realizada adicionando-se 1 ml da amostra diluída, 4 ml de água destilada e 5 ml de solução cetônica diluída. A solução cetônica diluída foi obtida adicionando-se 10 ml de solução cetônica (250 mg de difenilcarbazida diluída em volume de acetona PA suficiente para 100 ml de solução) em 40 ml de água destilada. As amostras, que apresentavam coloração violeta de diferentes intensidades, foram analisadas em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 550 nm.

Para a construção da curva padrão, foram pesados 10 mg de óxido de cromo em dois tubos micro Kjeldahl, os quais foram digeridos e diluídos como descrito acima. A reação colorimétrica foi, então, realizada adicionando-se 5 ml de cada diluição do padrão a 5 ml de solução cetônica diluída.

A produção de MS fecal total (MSF) foi estimada pela fórmula MSF (g/dia) = consumo do indicador (g/dia) / concentração do indicador nas fezes (g/gMS) (SMITH; REID, 1955).

Para a determinação do teor de FDNi, as amostras compostas de sobras, ingredientes e fezes, referentes aos 5 dias de coleta, foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 60°C por 72 horas e moídas em moinho de facas com a utilização de peneira de 2 mm (CASALI, 2006). Quadruplicatas de cerca de 0,5 g de amostra foram pesadas e acondicionadas em saquinhos de tecido não-tecido (TNT, 100 g/m^2), com dimensões de 4 x 5 cm, respeitando a relação de 20 mg MS/cm^2 de superfície (NOCEK, 1988; CASALI, 2006).

Duas vacas Holandesas, fistuladas no rúmen, foram adaptadas por sete dias com dieta a base de silagem de milho, farelo de soja e mistura mineral. Após o período de adaptação, duplicatas das amostras foram incubadas no rúmen de cada vaca, por um período de 264 horas, segundo adaptação da técnica descrita por Casali (2006). Após a retirada do rúmen, os saquinhos foram lavados em água corrente até total clareamento desses e imediatamente levados para estufa de ventilação forçada a 60°C por 72 horas. Em seguida os saquinhos

passaram por tratamento em detergente neutro, por uma hora, em sistema extrator de fibra Ankon® (MERTENS, 2002), após o qual as amostras foram lavadas com água quente e acetona, e secas em estufa não ventilada a 105°C por no mínimo 45 minutos. As amostras foram, então, acondicionadas em dessecador (20 saquinhos/dessecador) até resfriamento e pesadas, obtendo-se o teor de FDNi.

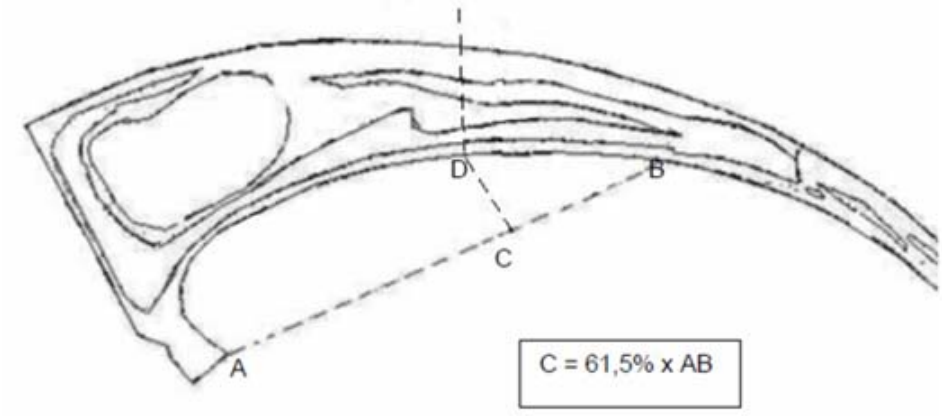
A digestibilidade aparente das dietas foi obtida a partir da fórmula: DIG = 100 – (100 x (% FDNi dieta / % FDNi fezes). O consumo de MS individual das novilhas foi, então, estimado a partir da fórmula: CMS = MSF / (1 – DIG).

O teor de energia digestível (ED) da dieta foi obtido a partir da energia bruta da dieta (EB) e dos valores de digestibilidade. O teor de energia metabilizável (EM) da dieta foi calculado considerando uma eficiência de transformação de ED em EM de 0,82% (NRC, 1996). A energia líquida de ganho da dieta (ELg) foi calculada a partir da fórmula: $ELg = 1{,}42*EM - 0{,}174*EM^2 + 0{,}0122*EM^3$ (NRC, 1996). Os consumos de energia foram calculados a partir do CMS estimado por animal e dos teores de energia na dieta.

4.5 Estimativa da Composição Corporal

Logo após a confirmação da ocorrência da puberdade e ainda durante a fase luteal, entre 10 a 14 dias do ciclo estral, as novilhas foram abatidas no Abatedouro Escola da Coordenadoria do *campus* de Pirassununga, Universidade de São Paulo, Pirassunuga, SP, e a composição da carcaça foi estimada por método indireto, através da análise da composição de cortes das 9ª-10ª-11ª costelas (seção HH).

Os animais foram atordoados com pistola pneumática e exangüinados por secção da veia jugular, após o que foi realizada a evisceração. As carcaças foram resfriadas em câmara fria de 0 a 2°C por 24 horas, após o que foram pesadas, obtendo-se o peso de carcaça fria (PCF). O peso de carcaça quente (PCQ) foi calculado como PCF + peso da carretilha (6 kg) + perda pelo resfriamento (4 kg), segundo procedimento normal do abatedouro. Após o corte das meias-carcaças, a espessura de gordura subcutânea (EGS) e a área de olho de lombo (AOL) foram mensuradas entre a 12ª e a 13ª costelas da meia-carcaça direita. O corte da seção HH foi realizado na meia-carcaça esquerda (Figura 2), segundo metodologia proposta por Hankins e Howe (1946).



Fonte: Adaptado de Putrino (2006)

Figura 2 - Vista da secção das 9ª-10ª-11ª costelas (seção HH), através de um corte perpendicular à coluna vertebral entre a 8ª e a 9ª e entre a 11ª e a 12ª costelas

A reta AB foi obtida da ponta ao final da costela. Em seguida foi determinado o ponto C, calculado com 61,5% da reta AB. Foi traçada uma reta perpendicular à reta AB, passando pelo ponto C e determinando o ponto D. O corte foi, então, realizado perpendicularmente à costela, passando pelo ponto D, sendo que a porção separada para análise (seção HH) era a porção contendo o músculo *Longissimus dorsi* (Figura 2). Após o corte, as amostras foram congeladas e armazenadas em freezer a -20°C, até análise posterior.

As amostras congeladas foram cortadas com serra elétrica de fita e moídas em moedor de grande porte no Laboratório de Classificação e Análise de Carcaças do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP. As amostras foram passadas duas vezes em peneira de 23 mm e duas vezes em peneira de 8 mm. Após homogeneização, foram coletados cerca de 350 g de amostra de cada animal, divididos em quatro placas de Petri descartáveis (quadruplicatas).

As amostras foram liofilizadas até peso constante, sendo determinado o teor de água da seção HH. A composição química corporal foi, então, estimada a partir do teor de água da seção HH, através de equações validadas para novilhos castrados da raça Nelore. O teor de água no corpo vazio (CVz) foi determinado segundo equação gerada por Lanna (1988) e citada por Putrino (2006), e o teor de extrato etéreo (EE) no CVz foi determinado por equação desenvolvida por Leme (1993):

% água no CVz = 24,1936 + (0,6574 * % água na seção HH)

$R^2 = 0,91$; $S_{yx} = 0,82$

% EE no CVz = 93,92968 – (1,27598 * % água no CVz)

$R^2 = 0,97$; $S_{yx} = 0,62$

Os teores de proteína e cinzas no CVz foram obtidos pelas relações entre proteína:água e cinzas:água de 0,3009 e 0,0747, respectivamente, estabelecidas por Leme et al. (1994) para novilhos Nelore.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, estruturado em classes. As médias de cada variável estudada foram obtidas pelo procedimento LSMEANS (SAS, 2000).

O diâmetro inicial do folículo dominante (DFi), assim como a idade e o PV iniciais e à puberdade, foram analisados pelo procedimento GLM (SAS, 2000), utilizando o modelo Y = Tratamento + μ + e, considerando o tratamento como única fonte de variação. Os efeitos da administração exógena de leptina e do aumento do consumo de energia na idade e no PV à puberdade foram avaliados através dos seguintes contrastes ortogonais: B vs. BL (efeito da leptina) e A vs. (B + BL) (efeito de dieta). O ganho de PV médio diário (GMD), os dados de carcaça (EGS, AOL, percentagem de MS, água, EE, PB e MM), a produção total de MS fecal (PTF), a digestibilidade aparente da MS e os consumos de MS, NDT e energia bruta, digestível e metabolizável foram analisados como descrito acima.

Uma vez que os dados de ECC não obedeceram às premissas de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, mesmo após transformação destes para escala logarítmica ou para raiz quadrada, optou-se pela análise não paramétrica através do teste de Kruskal-Wallis de uma via, que pode ser empregado mesmo nos casos onde há mais que dois tratamentos. Para determinar qual tratamento diferiu de qual, quanto ao ECC à puberdade, realizou-se análise não-paramétrica dois a dois.

O diâmetro máximo do folículo dominante (FD) foi analisado pelo procedimento MIXED para medidas repetidas no tempo (SAS, 2000), utilizando o modelo Y = Tratamento + Tempo + Tratamento*Tempo + μ + e, considerando tratamento, tempo e suas interações

como fontes de variação. O dia foi considerado como variável repetida e a novilha dentro do tratamento como o sujeito. Para análise da interação entre tratamento e tempo, realizou-se análise de regressão polinomial, sendo avaliados os componentes lineares e quadráticos das equações de DF em função do tempo.

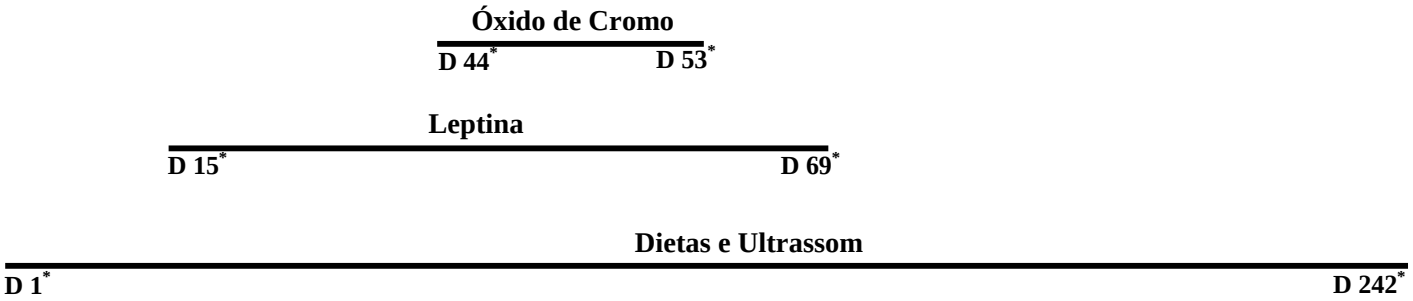
As taxas de ovulação das novilhas nos diferentes tratamentos foram avaliadas pelo programa GraphPad Prism, através de uma curva de sobrevivência, pelo teste de Mantel-Cox.

Para todas as análises estatísticas utilizou-se nível de significância de 5%, sendo considerada tendência valores de *P* entre 5 e 10%.

4.7 Cronograma de Atividades

Tabela 3 - Cronograma de atividades semanais

	Domingo	**Segunda**	**Terça**	**Quarta**	**Quinta**	**Sexta**	**Sábado**
6:00	leptina	leptina	leptina	leptina	leptina	leptina	leptina
7:00	Alimentação	Alimentação USG Coleta sangue	Pesagem ECC Alimentação	Alimentação USG	Alimentação USG Coleta sangue	Pesagem ECC Alimentação	Alimentação
18:00	leptina	leptina	leptina	leptina	leptina	leptina	leptina



* Dias em experimento

Figura 3 - Período experimental total (Dietas e Ultrassom), período de aplicação de leptina e período de administração de óxido de cromo

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Puberdade

Após a separação dos grupos experimentais observou-se que as variáveis idade, PV e ECC iniciais não diferiram entre os grupos (*P*>0,05) (Tabela 4). Não houve diferença no ECC inicial, mesmo quando a análise foi realizada dois a dois (*P*=0,1425), comparando o tratamento B com o BL, respectivamente os que apresentaram maior e menor valor numérico de ECC médio inicial (4,83 e 4,55, respectivamente). Não houve diferença (*P*>0,05) na média do diâmetro máximo do folículo dominante dos três grupos ao início dos tratamentos (0,74, 0,68 e 0,71 cm para os grupos A, B e BL, respectivamente). Em conjunto, os resultados indicam que, como desejado, os grupos experimentais eram inicialmente homogêneos (Tabela 4).

Houve efeito de dieta na variável idade à ovulação (*P*<0,05), sendo que os animais com maior consumo de energia ovularam mais jovens (698 ± 55 dias de idade), que os animais recebendo dieta pobre em energia (768 ± 43 e 748 ± 68 dias de idade para os grupos B e BL, respectivamente). Os grupos B e BL não diferiram entre si quanto à idade à primeira ovulação (*P*>0,05), indicando que a administração de leptina exógena não adiantou a primeira ovulação dos animais recebendo dieta pobre em energia. Da mesma forma, considerando o número de dias em experimento até a ocorrência da primeira ovulação, observou-se que o grupo A ovulou mais cedo (*P*<0,01), em média 74,5 ± 28,4 dias após o início dos tratamentos, enquanto que os grupos B e BL não diferiram entre si (*P*>0,05), ovulando após 142,5 ± 63,6 e 134,4 ± 62,4 dias de experimento, respectivamente (Tabela 4).

Como desejado, as novilhas recebendo maior teor de energia na dieta apresentaram maior ganho de peso médio diário (GMD) (*P*<0,01), que as novilhas recebendo dieta pobre em energia (1,20 ± 0,30 kg PV/dia para o grupo A vs. 0,46 ± 0,15 e 0,48 ± 0,14 kg PV/dia para os grupos B e BL, respectivamente), as quais não diferiram entre si (*P*>0,05). Não foi observado efeito de dieta (*P*=0,1741) ou da administração de leptina exógena (*P*>0,05) no PV à ovulação dos três grupos (358 ± 53, 341 ± 20 e 336 ± 26 kg PV para os grupos A, B e BL respectivamente). No entanto, o ECC à ovulação (5,63 ± 0,74 para o grupo A vs. 4,91 ± 0,30 para os grupos B e BL) diferiu de forma significativa entre os grupos com maior e menor consumo de energia na dieta (*P*<0,01) (Tabela 4). Apesar de os testes não-paramétricos

apontarem a existência de diferença entre tratamentos, porém não informarem qual tratamento difere de qual, uma vez que o ECC médio à ovulação do grupo B foi numericamente igual ao do grupo BL e ambos foram menores que o do grupo A, pode-se assumir que houve efeito de dieta, mas não da leptina exógena no ECC à ovulação. O fato de o grupo A haver ovulado com PV semelhante, porém com maior ECC que os grupos B e BL, demonstra que houve alteração na composição corporal à puberdade dos animais do grupo A, em relação aos outros dois grupos, determinada pelo maior consumo de energia.

Tabela 4 - Idade (Ii), peso vivo (PVi) e escore de condição corporal (ECCi) iniciais médios; ganho de peso vivo médio diário (GMD); idade (Iov), peso vivo (PVov) e escore de condição corporal (ECCov) médios à ovulação; número médio de dias em experimento (Dias exp.) até a ovulação de novilhas zebuínas de acordo com os tratamentos

	Tratamento[1]					*P*[2]	
Variáveis	A	B	BL	Média	EPM[3]	Ef. Dieta[4]	Ef. Leptina[5]
Ii (dias)	625,7	628,2	613,5	622,7	5,4	0,6817	0,2766
PVi (kg)	273,7	278,4	276,0	276,1	3,1	0,6044	0,7634
ECCi	4,73[a]	4,83[a]	4,55[a]	4,71	0,08	-	-
GMD (kg PV/dia)	1,20	0,46	0,48	0,71	0,10	0,0003	0,8833
Iov (dias)	698	768	748	742	11	0,0166	0,4196
Dias exp (dias)	74	143	134	121	11	0,0098	0,7333
PVov (kg)	358	341	336	344	6	0,1741	0,7534
ECCov	5,63[a]	4,91[b]	4,91[b]	5,10	0,10	-	-

[1] A – dieta de alta energia, B – dieta de baixa energia, BL – dieta de baixa energia com aplicação de oLeptina (4,8 µg/kg PV); [2] Probabilidade de diferença estatística; [3] Erro Padrão da Média; [4] Efeito de dieta (contraste entre o tratamento A e os tratamentos B + BL); [5] Efeito da leptina (contraste entre os tratamentos B e BL).
[a, b] Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis de 1 via (P<0,05).

A evolução das taxas de ovulação dos três tratamentos em relação aos dias em experimento, ou seja, porcentagem de novilhas ovuladas por tratamento, foi analisada através de uma curva de sobrevivência (Figura 4). Segundo o teste Mantel-Cox, houve diferença nas curvas de ovulação entre os grupos (P<0,05), sendo que a maior ingestão de energia adiantou a ovulação do grupo A, confirmando o resultado obtido a partir da idade média à ovulação, apresentados na Tabela 4. Quando o teste foi realizado dois a dois, no entanto, não foi observada diferença (P>0,05) entre os grupos B e BL. Aos 121 dias de experimento 100% das novilhas do grupo A já haviam ovulado, contra apenas 55% das novilhas do grupo B e do grupo BL, que só alcançaram 100% de ovulação com 240 dias de experimento. Fica evidente, assim, o marcante efeito do teor energético da dieta e a ausência de efeito da administração

exógena de leptina na taxa de ovulação dos diferentes tratamentos, sendo que o aumento no consumo de energia acelerou a ocorrência dos eventos que levam à puberdade.

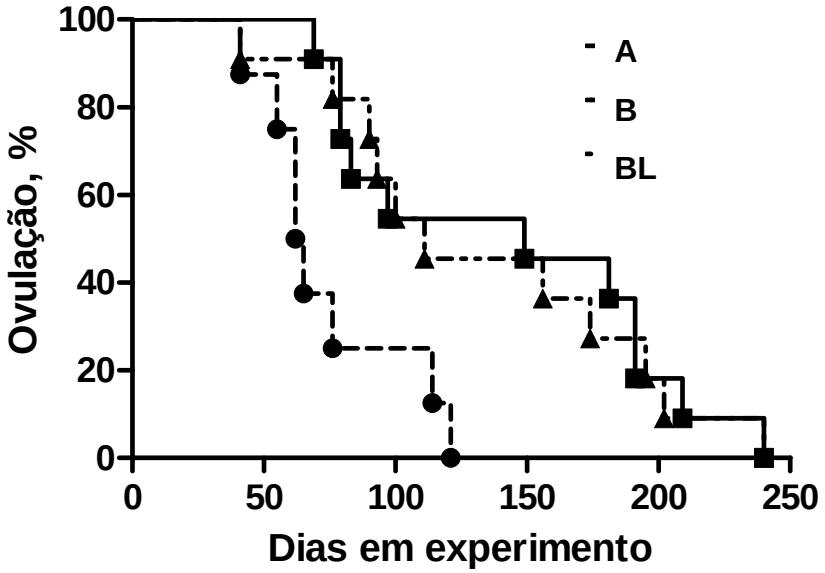


Figura 4 - Taxa de ovulação dos três tratamentos de acordo com o tempo. A – dieta de alta energia (●); B – dieta de baixa energia (■); BL – dieta de baixa energia + 4,8 µg oLeptina/kg PV (▲).

Já foi demonstrado anteriormente, que a nutrição e a obtenção de uma massa mínima de gordura corporal são fatores determinantes para o desenvolvimento da puberdade (KENNEDY; MITRA, 1963; VAN DER SPUY, 1985; BRONSON, 1988; FRISCH, 1972, 1980; FRISCH; McARTHUR, 1974) e que a restrição alimentar pode atrasar ou até mesmo impedir a maturação sexual em humanos e diversas outras espécies de mamíferos (VAN DER SPUY, 1985). A literatura já relatou a existência de sinais metabólicos indicadores da quantidade de reservas energéticas (tecido adiposo) ao sistema nervoso central, relacionados com a idade à puberdade (FRISCH; McARTHUR, 1974; FRISCH, 1980;). Como comentado anteriormente, a leptina parece ser um desses sinais, atuando no sistema neuroendócrino e na regulação da reprodução (AHIMA et al., 1996; BARASH et al., 1996).

Em concordância com os resultados apresentados neste estudo, Bergfeld et al. (1994) também observaram redução na idade à puberdade de novilhas recebendo maior teor de energia na dieta, quando comparadas com animais com baixo consumo de energia (372 ± 7 dias vs. 435 ± 9 dias, $P<0,003$), entretanto, ao contrário do observado no presente

experimento, os autores relataram aumento do PV à puberdade (263 ± 3 kg vs. 221 ± 3 kg, $P<0,01$) das novilhas com maior consumo energético.

Garcia et al. (2002), avaliando 42 novilhas com 7 a 9 meses de idade, PV inicial de 292 ± 3,2 kg e GMD de 1,1 ± 0,01 kg PV/dia, semelhante grupo de alto consumo de energia (grupo A) do presente estudo, observaram aumento linear significativo do PV, da expressão do RNAm da leptina e da concentração de leptina sérica com o aproximar da puberdade, independente da época do ano, sendo o PV médio à puberdade de 370 ± 2,2 kg, valor semelhante ao obtido pelo grupo A do presente experimento. Segundo os autores, a concentração sérica de leptina passou de 3,8 ± 0,4 ng/ml, 16 semanas antes da puberdade, para 6,4 ± 0,4 ng/ml, na semana da puberdade, o que pode ter ocorrido tanto pelo aumento no número de células do tecido adiposo, devido ao alto GMD, quanto pela maior expressão do gene *ob* no tecido adiposo. Através de análises de regressão, os autores demonstraram que o PV foi a variável que mais contribuiu com a variação na idade à puberdade, estando a concentração sérica de leptina em segundo lugar. Almog et al. (2001) observaram aumento de 2 a 5 vezes no nível de leptina sérica de ratas imaturas tratadas com leptina exógena, em relação aos controles, sendo que os animais controle apresentaram aumento moderado na leptina sérica entre os dias 22 a 29 do experimento, confirmando a noção de que a concentração de leptina no sangue de mamíferos aumenta com o aproximar da puberdade (CHEHAB et al., 1997).

A partir de tais observações, pode-se assumir que, apesar de não terem apresentado diferença no PV à ovulação, o maior GMD das novilhas do grupo A, determinando maior acúmulo de tecido adiposo, como evidenciado pelo maior ECC, determinou um aumento mais rápido da concentração sérica de leptina, em comparação com os grupos em menor GMD. Estes animais, então, provavelmente alcançaram o nível mínimo de leptina necessário para permitir a ocorrência da puberdade, mais rapidamente que os outros grupos, determinando, assim, a menor idade à puberdade.

A administração de leptina exógena, entretanto, foi incapaz de acelerar a puberdade das novilhas em baixo consumo de energia (grupos B e BL) deste estudo.

O estado de privação alimentar, ao reduzir a massa de tecido adiposo corporal, reduz a concentração sérica de leptina (MAFFEI et al., 1995) ao mesmo tempo que prolonga o diestro de camundongos sexualmente maduros em restrição alimentar aguda (AHIMA et al., 1996). Nestes casos, a administração de leptina pode prevenir os efeitos deletérios do estresse metabólico na função reprodutiva (AHIMA et al., 1996).

Tratando camundongas sexualmente imaturas e alimentadas *ad libitum* com 2 µg de leptina/g PV/dia, dose que não foi suficiente para alterar o PV, Ahima et al. (1997) observaram adiantamento na obtenção da puberdade e concluíram que a leptina representa o gatilho para a ativação do eixo reprodutivo, atuando diretamente e não de forma secundária ao balanço energético. Tais resultados, entretanto, divergem de vários outros trabalhos na literatura, que demonstram que a ação estimulatória da leptina exógena sobre o eixo reprodutivo ocorre apenas em estados de restrição alimentar.

Cheung et al. (1997) administraram 6,3 µg de leptina recombinante humana/g PV, duas vezes ao dia, em ratas pré-púberes alimentadas *ad libitum* ou com 70% do consumo daquele grupo, e observaram que o modesto retardo no crescimento, devido à restrição alimentar leve, retardou a obtenção da puberdade e que a administração de leptina reverteu o quadro, adiantando a maturação sexual nesses animais. A leptina, no entanto, não adiantou a puberdade além da idade apresentada pelo grupo alimentado *ad libitum*. Já quando o tratamento foi aplicado em animais em severa restrição alimentar, apesar de adiantar a puberdade, a leptina não igualou a idade à puberdade com a de animais alimentados *ad libitum.* Vários outros autores demonstraram resultados semelhantes em bovinos e ovinos, sugerindo que a leptina atue de modo permissivo, e não como um gatilho, no desenvolvimento sexual (NAGATANI et al., 2000; HENRY et al., 2001; AMSTALDEN et al., 2002; 2003).

Maciel et al. (2004a), avaliaram os efeitos da administração subcutânea de 19,2 µg leptina recombinante ovina/kg PV, duas vezes ao dia, por 40 dias, no padrão de secreção de LH, responsividade da adenohipófise ao GnRH, concentração de hormônios circulantes e obtenção da puberdade de 14 novilhas pré-púberes Hereford x Brahman, com PV médio de 304,7 ± 4,12 kg, e ganhando 0,32 ± 0,09 kg PV/dia, semelhante ao ganho apresentado pelos grupos de baixa energia do presente estudo. Os autores, assim como neste estudo, também não observaram efeito da administração de leptina exógena na idade à puberdade. Também não foi relatada alteração na concentração sérica média, freqüência ou amplitude de pulsos de LH dos animais tratados em relação aos controles. A ausência de efeito da leptina em acelerar a obtenção da puberdade de novilhas em baixo consumo de energia, tanto no presente estudo quanto no trabalho de Maciel et al. (2004a), pode ter ocorrido devido à dose de leptina utilizada.

Diversos estudos demonstraram a importância da dose na presença, ausência e tipo de efeito biológico produzido pela leptina. Duggal et al. (2000) demonstraram que a administração sistêmica de altas doses de leptina em ratas inibiu a ovulação, mesmo na

presença de FSH exógeno. Zieba et al. (2003) observaram que vacas maduras em jejum agudo, mas com reservas significativas de gordura corporal, apresentam resposta biológica inversamente proporcional à dose de leptina exógena utilizada, sendo esta um fator crítico para o estímulo da secreção de LH. Yu et al. (1997) avaliaram o efeito da administração *in vitro* de leptina, em explantes de adeno-hipófise e hipotálamo de ratas adultas e observaram indução da liberação de LH pela adeno-hipófise, com doses entre 10^{-11} e 10^{-7} M, e ausência de feito com doses maiores. A secreção de FSH se comportou de modo semelhante, porém com menor sensibilidade à leptina, sendo necessárias doses maiores (10^{-9} M) para estimular a secreção do hormônio. Da mesma forma, doses baixas de leptina (10^{-12} e 10^{-10} M) estimularam a secreção de GnRH pelos explantes de hipotálamo. *In vivo*, a administração central de leptina (10 µg, 0,6 nmol) também aumentou a concentração plasmática de LH, mas não alterou a secreção de FSH.

A dose de leptina considerada ideal para estudos em novilhas seria aquela necessária para elevar a leptina sérica dos animais tratados para 5 a 10 ng/ml por um período de 8 a 12 horas após uma única injeção (MACIEL et al., 2004a). O critério utilizado baseia-se na observação de que vacas de corte maduras, ciclando normalmente, apresentam concentração sérica de leptina entre 15 e 20 ng/ml e que a concentração de leptina sérica na semana de ocorrência da puberdade de novilhas ganhando 1,1 kg PV/dia foi de 6,4 ± 0,4 ng/ml (GARCIA et al., 2002), de modo que a concentração alvo representa níveis fisiológicos de animais bem nutridos, ciclando normalmente.

No mesmo trabalho citado acima, Maciel et al. (2004a) realizaram um estudo preliminar, comparando três doses de leptina recombinante ovina (4,8; 9,6 e 19,2 µg/kg PV), aplicadas em 11 novilhas com 318 ± 5,11 kg PV e ECC médio de 5. As três doses testadas elevaram a leptina sérica após 15 minutos da aplicação. A maior dose gerou a maior concentração sérica de leptina, com pico de 12,1 ± 2,23 ng/ml após 1 hora da aplicação, a qual permaneceu elevada acima do controle por 12 horas. As outras doses também determinaram aumento, embora de menor intensidade, do nível sérico de leptina, no entanto, após 6 horas da aplicação este valor não diferiu mais do controle, de forma que os autores optaram pela utilização da maior dose (19,2 µg/kg PV). Durante o experimento de Maciel et al. (2004a), nos primeiros 10 a 15 dias de tratamento, o nível sérico de leptina permaneceu dentro do esperado, entretanto, observou-se aumento quase linear da concentração nos animais tratados, a qual alcançou valores duas a três vezes maiores que o esperado, durante o tratamento de longo prazo (40 dias), o que pode ter resultado na ausência de efeito observada na ocorrência

da puberdade, assim como na secreção de gonadotrofinas, através do desenvolvimento de um estado de resistência à leptina.

Maciel et al. (2004a) chamam a atenção, também, para o fato de a concentração de leptina das novilhas de seu grupo controle, que apresentavam GMD semelhante às do grupo com baixo consumo de energia deste estudo, ter se mantido dentro dos valores esperados para novilhas em desenvolvimento que atingiram a puberdade normalmente (GARCIA et al., 2002). Como comentado anteriormente, um dos fatores primários associados ao aumento no número de receptores de leptina no hipotálamo ventromedial de ovelhas é a subnutrição (DYER et al., 1997). Vários estudos, realizados em ovinos e bovinos, sugerem que tanto o jejum quanto a restrição crônica e severa da ingestão de energia, determinando redução da massa de tecido adiposo e, conseqüentemente, de leptina sérica, hipersensibilizam o eixo hipotálamo-hipófise ao hormônio (NAGATANI et al., 2000; HENRY et al., 2001; AMSTALDEN et al., 2002; 2003).

Devido à quantidade de leptina disponível para o estudo, e ao fato de a utilização da dose mais alta (19,2 µg de leptina/kg PV) ter elevado a concentração sérica muito acima dos valores fisiológicos, durante o tratamento de longo prazo, provavelmente determinando um estado de resistência (MACIEL et al., 2004a), optou-se, no presente estudo, pela utilização da dose mais baixa (4,8 µg leptina/kg PV), também capaz de elevar a leptina sérica (MACIEL et al., 2004a). Entretanto, ainda assim, a leptina se mostrou incapaz de adiantar a puberdade das novilhas em restrição alimentar. Há duas razões principais que podem explicar o ocorrido. A restrição de energia na dieta dos grupos B e BL pode não ter sido suficiente para reduzir o nível de leptina endógena daqueles animais, de forma que o eixo hipotálamo-hipófise se tornasse responsível à leptina exógena administrada. Por outro lado, o tratamento de longo-prazo (56 dias), apesar da utilização de dose relativamente baixa de leptina, pode ter resultado em níveis ainda acima do fisiológico, determinando o desenvolvimento de resistência.

5.2 Função Ovariana

A análise de medidas repetidas no tempo demonstrou efeito de tratamento (P=0,0542), tempo (P<0,0001) e interação entre tratamento e tempo (P<0,001) no diâmetro máximo do folículo dominante (FD) (dados não apresentados), indicando que o aumento do diâmetro máximo do FD com o tempo não pôde ser explicado pelo mesmo modelo para os três

tratamentos. O tratamento BL apresentou valor significativo do componente linear ($P<0,001$) e quadrático ($P=0,0110$), enquanto que os tratamentos A e B apresentaram valores significativos apenas para o componente linear ($P<0,001$), sendo o componente quadrático não significativo ($P>0,05$) (Tabela 5). A comparação dos parâmetros indicou que o *slope* linear da curva de regressão do diâmetro máximo do FD em função do tempo diferiu entre os tratamentos A e B ($P<0,001$), assim como entre os tratamentos B e BL ($P<0,05$), indicando que a velocidade de crescimento folicular foi influenciada tanto pelo maior consumo de energia na dieta, quanto pela administração de leptina exógena nas novilhas com baixo consumo de energia.

Em resumo, o diâmetro máximo do FD dos grupos A e B aumentaram linearmente no tempo, enquanto que o grupo BL apresentou um comportamento quadrático, com aumento seguido por diminuição da taxa de crescimento folicular (Figura 6).

As curvas apresentadas na figura 6 demonstram que o aumento no consumo de energia acelerou o crescimento folicular das novilhas do grupo A, em relação às novilhas com menor consumo de energia (grupos B e BL). A administração de leptina exógena, por sua vez, acelerou o crescimento folicular das novilhas recebendo dieta pobre em energia, quando comparadas com os animais não tratados e submetidos ao mesmo regime alimentar. Apesar de aumentada, no entanto, a taxa de crescimento folicular do grupo BL não alcançou a mesma intensidade observada no grupo recebendo dieta rica em energia. Após cerca de 30 dias de tratamento, apesar de os folículos das novilhas tratadas com leptina exógena continuarem crescendo, a velocidade do crescimento foi reduzida, praticamente igualando-se com a apresentada pelo grupo não tratado (grupo B). Tais observações indicam uma perda do efeito estimulatório da leptina sobre o sistema reprodutivo, com o tratamento de longo-prazo, falando em favor do possível desenvolvimento de um estado de resistência à leptina.

Os coeficientes de determinação (R^2) das equações de regressão (0,45; 0,31 e 0,41 para os tratamentos A, B e BL respectivamente) indicam que outros fatores, além da concentração sérica de leptina, também influenciam o desenvolvimento folicular de novilhas pré-púberes (Figura 6). Ainda, a característica cíclica do desenvolvimento folicular dificulta a análise de regressão polinomial.

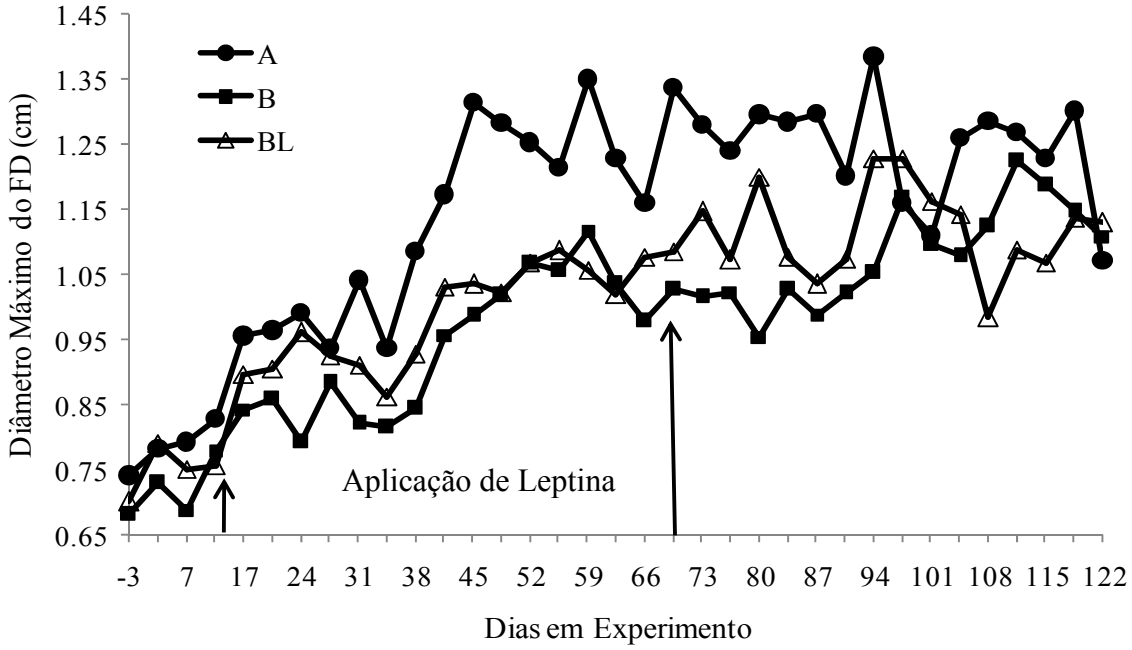


Figura 5 - Efeito dos tratamentos no diâmetro máximo do folículo dominante (cm). A – dieta de alta energia (●), B – dieta de baixa energia (■); BL – dieta de baixa energia + 4,8 µg oLeptina/kg PV (△)

Tabela 5 - Intercepto, componente linear e componente quadrático das equações de regressão do diâmetro máximo do folículo dominante dos tratamentos em função do tempo

Item	Tratamento[1]			*P*[2]	
	A	B	BL	A x B[4]	B x BL[5]
Intercepto	0,717	0,717	0,717	-	-
P[3]	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
Linear	0,013	0,005	0,008	<0,0001	0,0181
P[3]	<0,0001	<0,0001	<0,0001		
Quadrático	$-5{,}6*10^{-5}$	$-5{,}0*10^{-7}$	$-4{,}7*10^{-5}$	-	-
P[3]	0,4210	0,6527	0,0110		

[1] A – dieta de alta energia, B – dieta de baixa energia, BL – dieta de baixa energia com aplicação de oLeptina (4,8 µg/kg PV); [2] Probabilidade de diferença estatística do componente linear entre os tratamentos; [3] Probabilidade do intercepto, componente linear e componente quadrático de cada tratamento de ser diferente de 0; [4] Comparação dois a dois do tratamento A com o tratamento B; [5] Comparação dois a dois do tratamento B com o tratamento BL.

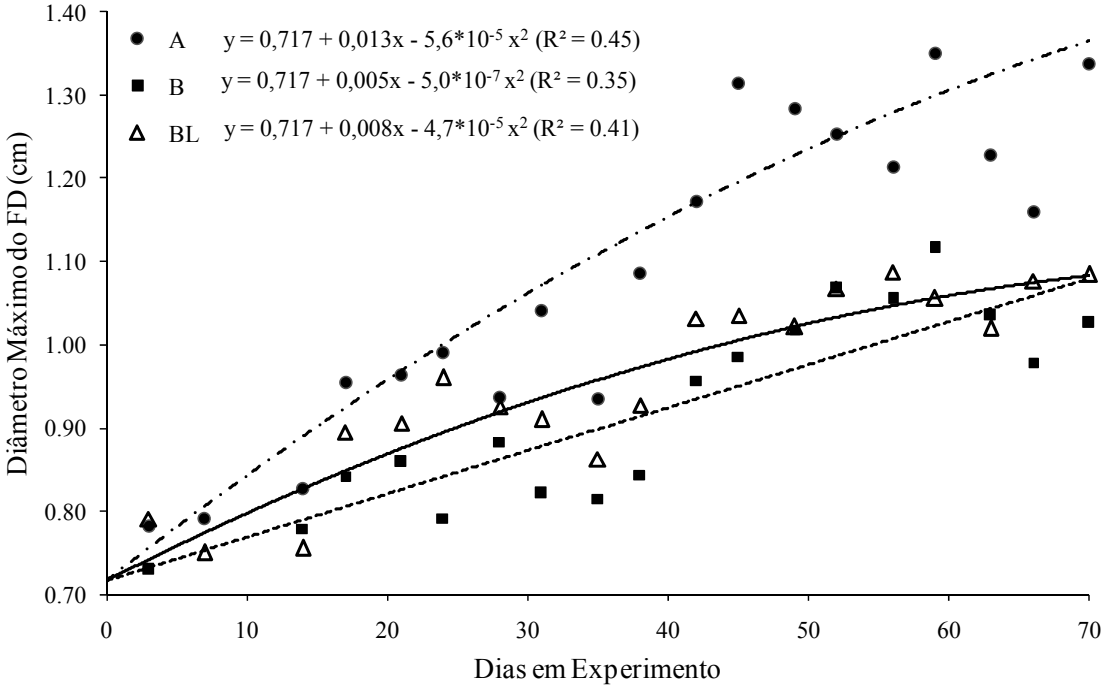


Figura 6 Linhas de tendência, equações de regressão e coeficientes de variação (R^2) do diâmetro máximo do folículo dominante (cm) em função do tempo, durante o período de aplicação de leptina, de acordo com os diferentes tratamentos. A – dieta de alta energia (●), B – dieta de baixa energia (■); BL – dieta de baixa energia + 4,8 µg oLeptina/kg PV (△)

O padrão de desenvolvimento folicular observado neste experimento, aumentando linearmente com o tempo, independente do nível de consumo de energia, assemelha-se ao relatado por Bergfeld et al. (1994), que trabalhando com novilhas pré-púberes com média de 8 meses de idade, também observaram um aumento linear no diâmetro máximo do FD, com o aproximar da primeira ovulação, tanto no grupo de alto quanto no de baixo consumo de energia. O GMD observado pelos autores, de 0,9 kg PV/dia ou 0,3 kg PV/dia, também se assemelhou ao observado neste experimento. Bergfeld et al. (1994) relataram, também, que não houve diferença na taxa de crescimento ou de regressão do FD nos dois grupos e, assim como no presente estudo, observaram que o maior consumo de energia acelerou o desenvolvimento folicular, determinando maior diâmetro do FD em idade média menor, comparando com o grupo de menor GMD.

Em resumo, quando comparadas em idades fisiológicas fixas (30, 60, 90 ou 120 dias antes da puberdade), as novilhas dos dois grupos não apresentaram diferença no diâmetro do FD, assim como no diâmetro do folículo ovulatório à puberdade (12,07 ± 0,98 mm vs. 12,40 ± 0,40 mm). Porém a diferença ficou evidente quando a comparação foi feita em idades

cronológicas fixas, demonstrando que os eventos responsáveis pela maturação sexual foram semelhantes nos dois grupos, mas apresentaram cronologia diferente, sendo que o maior consumo de energia acelerou os eventos que levam à puberdade, em novilhas com maior GMD.

Outros estudos, realizados com novilhas após a puberdade, corroboram tais observações, demonstrando que o diâmetro do FD dos animais em restrição energética é menor que o dos animais consumindo níveis moderados de energia (MURPHY et al., 1991; RHODES et al., 1993). Romano et al. (2007) avaliaram a dinâmica folicular de 31 novilhas zebuínas de 6 meses de idade recebendo alto ou baixo nível de energia na dieta e observara, que os animais com maior consumo de energia apresentaram menor idade à puberdade ($P<0,05$) e maior diâmetro do FD, mas não diferiram quanto ao PV (302,33 ± 27,31 vs. 326,19 ± 27,78 kg para os grupo de baixo e alto consumo de energia respectivamente, $P>0,05$), estando os resultados de acordo com os apresentados neste estudo.

Os mecanismos pelos quais o consumo de energia influencia o desenvolvimento ovariano ainda não foram totalmente elucidados (BERGFELD et al., 1994). Observa-se que a concentração de FSH circulante sofre um aumento, precedendo a emergência de uma onda folicular, e que sua concentração declina a partir do início da divergência em um folículo dominante e vários folículos subordinados (ADAMS et al., 1992). Entretanto, estudos anteriores falharam em demonstrar uma relação direta entre concentração de FSH e restrição do consumo de energia em ovinos (XU et al., 1989) e bovinos (ADASHI et al., 1985). Por outro lado, o IGF-I, diretamente influenciado pelo status nutricional, parece modular o efeito do FSH no desenvolvimento folicular (ADASHI et al., 1985; SPICER et al., 1990), aumentando a sensibilidade das células da granulosa ao hormônio folículo estimulante (ADASHI et al., 1985) e sugerindo que a influência da nutrição no processo de dominância folicular ocorra através dos níveis séricos e/ou intra-ovarianos de IGF-I (MURPHY et al., 1991).

Apesar de a administração de leptina exógena não haver adiantado a puberdade das novilhas recebendo dieta com baixo nível de energia (grupo BL), o presente experimento demonstrou um claro efeito estimulatório da leptina no desenvolvimento folicular, pelo menos na fase inicial do tratamento hormonal. Uma série de estudos, realizados em cultura de folículos inteiros demonstram que a leptina estimula a atividade da aromatase e a produção de estrógenos em células da granulosa (KITAWAKI et al., 1999), sendo que 10 ng/ml de leptina estimulou a produção de esteróides pelas células da granulosa de suínos (RUIZ-CORTEZ et

al., 2003). O aumento na produção de estrógeno explicaria o aumento do crescimento folicular observado no presente estudo.

De forma contrária, Swain et al. (2004), estudando culturas de folículos pré-antrais (secundários) de camundongos, em meio contendo insulina e gonadotrofinas, tratadas com 0, 50, 100 ou 200 ng de leptina recombinante murina/ml por 9 dias, observaram um efeito inibitório direto da leptina no crescimento folicular, apesar desta estimular a esteroidogênese induzida pela insulina e por gonadotrofinas. As doses maiores (200 ng de leptina/ml) inibiram o crescimento folicular mais acentuadamente que doses menores e determinaram maior aumento na secreção folicular de progesterona, testosterona e estradiol.

Entretanto, os efeitos da leptina na produção de esteróides não se tornaram evidentes antes de 7 dias de tratamento. Justificando os resultados de Swain et al. (2004), diversos estudos demonstraram que níveis elevados de andrógenos resultam em atresia folicular e aumento na taxa de apoptose das células da granulosa de roedores, além de inibir a expressão de receptores de LH nos folículos (BILLIG et al., 1993). Entretanto, os dados existentes sobre os possíveis efeitos estimulatórios ou inibitórios dos andrógenos no crescimento folicular são conflitantes (MURRAY; SPEARS, 2000).

Outros autores, entretanto, demonstram um efeito inibitório da leptina na esteroidogênese induzida pela insulina e fatores de crescimento, em células da teca e da granulosa (SPICER; FRANCISCO, 1997; ZACHOW; MAGOFFIN, 1997; SPICER; FRANCISCO, 1997, 1998; AGARWAL et al., 1999; BRANNIAN et al., 1999; BARKAN et al., 1999; ZACHOW et al., 1999). Zachow e Magoffin (1997) demonstraram que a leptina prejudica a produção de estradiol por células da granulosa de ratas, na presença de IGF-I e FSH, enquanto Agarwal et al. (1999) demonstraram efeito semelhante em células da granulosa e da teca em humanos. Brannian et al. (1999) demonstraram que a leptina inibe a produção de progesterona estimulada por gonadotrofinas e pela insulina em células da granulosa. Duggal et al. (2002) demonstraram que a leptina inibiu a produção de estrógenos por células da granulosa isoladas, mas não teve efeito em folículos inteiros de ratos, cultivados por 4 horas. Já Spicer et al. (2000) observaram que a leptina não alterou a produção basal de esteróides, mas preveniu seu aumento.

Kikuchi et al. (2001) estudaram o efeito de 0 a 1000 ng de leptina/ml em folículos pré-antrais de camundongos jovens e adultos, cultivados *in vitro* por 4 dias, em presença de insulina. Tanto a administração de GH quanto de IGF-I, associados ao FSH, aumentaram o número de células da granulosa e o tamanho dos folículos em camundongas imaturas, efeitos que foram bloqueados, de forma dose-dependente, pela administração da leptina. A

administração de GH, na ausência de FSH, determinou aumento significativo no diâmetro folicular e na secreção de estradiol, sendo que a administração de doses crescentes de leptina, neste caso, não apresentou efeito algum.

Avaliando os folículos pré-antrais das camundongas adultas, observou-se que o FSH estimulou o crescimento folicular e o número de células da granulosa e que a adição de leptina, em doses de 10 a 100 ng/ml, inibiu os efeitos do FSH de uma maneira dose-dependente. Os autores conlcuíram que a leptina não apenas inibe a proliferação das células da granulosa, mas que seu efeito inibitório no crescimento folicular é dependente da presença de FSH, hormônio estimulador da esteroidogênese das células da granulosa, da diferenciação celular e do desenvolvimento folicular; provavelmente através de um mecanismo envolvendo bloqueio na via do AMPc.

De forma geral, a maioria dos trabalhos avaliou o efeito da leptina na esteroidogênese através de tratamentos curtos (de até 4 dias) em modelos *in vitro,* utilizando culturas de folículos e até mesmo de células da teca e/ou da granulosa purificadas e isoladas. Desta forma ficam excluídos diversos fatores parácrinos e endócrinos, como os efeitos de feedback do hipotálamo e da hipófise, que poderiam influenciar e/ou mediar a influência da leptina na função secretória folicular.

A administração de doses fisiológicas de leptina em ratas estimulou a produção de progesterona e testosterona pelos ovários (CANNADY et al., 2000) e elevou a concentração de StAR, proteína integrante do sistema enzimático do citocromo p450, indicando aumento da capacidade esteroidogênica (RUIZ-CORTEZ et al., 2003). Observa-se que a administração de leptina induz a liberação de LH em ratas ovariectomizadas (McCANN et al., 1998) e normais (FOSTER; NAGATANI, 1999), e em ovelhas, após administração intracerebroventricular (HENRY et al., 2001). Desta forma, o efeito da leptina no eixo hipotálamo-hipofisário pode, em alguns momentos, ser independente da função ovariana e, além disso, pode suplantar o possível efeito inibitório direto da leptina na esteroidigênese das células da granulosa.

O presente estudo, entretanto, utilizou um modelo *in vivo* e um período longo de tratamento, o que pode explicar a aparente discrepância de resultados. Fica evidente, portanto, a importância do modelo utilizado para o estudo do efeito da leptina na função ovariana.

A administração de 0,3; 1,3 ou 10 µg de leptina subcutânea/0,1 ml PBS-BSA (1mg/ml), por 28 dias, em ratas sexualmente imaturas (21 dias de idade) alimentadas *ad libitum* (ALMOG et al., 2001) acelerou dramaticamente a obtenção da puberdade, não havendo diferença entre as doses de 1 e 10 µg, enquanto que o efeito foi menos evidente com a dose de 0,3 µg. A leptina causou hipertrofia da camada de células da granulosa de alguns

folículos antrais e reduziu de forma marcante a quantidade de núcleos picnóticos. Secções dos ovários, coradas pela coloração de TUNEL, revelaram baixa incidência de folículos antrais e pré-antrais apoptóticos/atrésicos, ou seja, com mais de 6 núcleos picnóticos, (11,5%5 do total de folículos nos animais tratados com 1 µg leptina/dia por 7 dias contra 51,6% no grupo controle; *P*<0,001). Os ovários dos animais tratados eram aproximadamente 2 vezes mais pesados que os dos controles (*P*<0,001) e os níveis basais de progesterona, LH e FSH, no dia 14, também estavam elevados. A expressão da StAR estava bastante aumentada nos animais tratados (87% acima do controle), após 13 dias de aplicação de leptina, enquanto que o aumento só foi observado após 21 dias de experimento, nos animais controle, sugerindo que a capacidade esteroidogênica dos ovários dos animais tratados sofre elevação em período anterior aos animais controle, coincidindo com a ocorrência da puberdade em ambos os grupos. Os autores observaram aumento de 4,7 vezes na relação *Bcl-2/Bax*, genes determinantes da sobrevivência e da morte celular, respectivamente (*P*<0,001). A maior expressão do *Bcl-2* foi encontrada nos animais tratados com 10 µg de leptina, a maior dose utilizada no experimento.

A alteração dessa relação *Bcl-2/Bax* pode representar uma parte importante do mecanismo periférico de ação da leptina, atenuando a apoptose e elevando a proliferação das células da granulosa (KORSMEYER et al., 1993). Alguns autores observaram que a superexpressão do gene *Bcl-2*, em camundongas transgênicas, causa redução da apoptose folicular e elevação na foliculogênese (HSU et al., 1996; HSU; HSUEH, 2000), enquanto que a deleção do gene *Bax* determina importante aumento no tempo de vida das células ovarianas (PEREZ et al., 1999). Recentemente demonstrou-se que a lipoapoptose de células β pancreáticas é bloqueada pela expressão do gene *Bcl-2* dependente de leptina (SHIMABUKURU et al., 1998), comprovando o envolvimento do *Bcl-2* no mecanismo de ação da leptina na atenuação da apoptose ovariana.

Entretanto, o desenvolvimento folicular, por si só, não é suficiente para desencadear a ovulação, o que sugere que a leptina apresente efeito duplo, podendo afetar diretamente as células da granulosa, através de receptores específicos, ou indiretamente, através da indução da liberação de FSH e LH, que atuam como fatores de sobrevivência dessas células (YU et al., 1997; AMSTERDAM; SELVARAJ, 1997).

O desenvolvimento folicular está relacionado com a ovulação, de forma que a maior velocidade de crescimento dos folículos resultaria em menor idade à ovulação e, portanto, à puberdade, como foi observado pelas novilhas do grupo A. Entretanto, o aumento na taxa de crescimento folicular do grupo BL não foi suficiente para igualá-la ao grupo A, o que pode ter

ocorrido por duas razões: 1) a dose de leptina exógena utilizada pode não ter sido capaz de elevar a concentração sérica do hormônio para níveis similares aos das novilhas com maior consumo de energia; 2) a dose de leptina utilizada pode ter elevado a concentração sérica de leptina de uma forma muito acentuada, devido ao tratamento de longo-prazo, levando ao estado de resistência.

O fato de a velocidade de crescimento folicular ter aumentado e depois diminuído demonstra que a leptina exógena influenciou a função ovariana, num primeiro momento, falando a favor do desenvolvimento de resistência como explicação mais provável para a ausência de efeito na idade à puberdade. Inicialmente, o tratamento provavelmente aumentou a concentração sérica de leptina, mantendo-a dentro dos valores fisiológicos de animais com reservas significativas de gordura corporal, resultando em aumento na taxa de crescimento folicular. No entanto, o tratamento de longo prazo pode ter elevado demais essa concentração determinando o aparecimento de resistência e perda do efeito no crescimento folicular e, provavelmente, na ovulação. Pode-se especular que a administração de menor dose de leptina poderia manter a concentração sérica do hormônio dentro dos níveis desejados, resultando em manutenção da maior taxa de desenvolvimento folicular do grupo BL em relação ao grupo B, observada inicialmente, e no adiantamento da ovulação e, portanto, da puberdade daquelas novilhas.

O mecanismo pelo qual se dá o processo de resistência á leptina ainda não foi bem esclarecido. Aparentemente, sua alta concentração sérica determina alterações no número de receptores e de moléculas sinalizadoras de leptina no organismo (EMILSSON et al., 1999). Alguns autores acreditam que haja um desbalanço na ligação da leptina com proteínas carreadoras plasmáticas, alterando seu tempo de meia-vida e o transporte através da barreira hemato-encefálica (HOUSEKNECHT et al., 1996; BANKS et al., 2004).

Emilsson et al. (1999), administraram 1,5 mg leptina/kg PV, via intraperitoneal, por dois dias, em camundongos normais e obesos (*ob/ob*) e observaram elevação da expressão das moléculas supressoras da sinalização da leptina SOCS-3 e CIS, entre duas e nove vezes, nos vários tecidos alvo da ação da leptina, tanto centrais (cérebro e hipotálamo) quanto periféricos (fígado, tecido adiposo e intestino delgado), tanto nos indivíduos normais quanto nos geneticamente obesos. Diversas citocinas, como a leptina, estimulam a transcrição dos genes *SOCS* e *CIS* e a contínua expressão destes supressores pode tornar os tecidos alvo não responsíveis às citocinas em questão. Ao contrário, a inibição da ativação da STAT, por exemplo por redução dos níveis de leptina, pode reduzir a expressão do gene *SOCS,* restabelecendo a responsividade dos tecidos alvo. Segundo os autores, esse pode ser um

mecanismo pelo qual níveis aumentados de leptina sérica causam o quadro de resistência à leptina.

Diversas proteínas ligadoras de leptina foram descritas em humanos e roedores (SINHA et al., 1996), sendo uma delas identificada como o domínio extracelular do receptor de leptina (HOUSEKNECHT et al., 1996). As proteínas carreadoras de leptina representam papel crítico no transporte da leptina através da barreira hematoencefálica (GOLDEN et al., 1997) e, aparentemente, também no desenvolvimento de resistência à leptina. Garcia et al. (2002), entretanto, não identificaram a presença de nenhuma dessas proteínas no soro de novilhas, através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Banks et al. (2004) demonstraram que o alto nível de triglicerídeos séricos inibe rapidamente o transporte de leptina através da barreira hemato-encefálica em humanos, levando ao estado de resistência freqüentemente observado nos casos de obesidade. Entretanto, além da obesidade, a subnutrição também eleva o nível de triglicerídeos séricos em humanos, em decorrência da mobilização da gordura corporal (KASTIN; AKERSTROM, 2000), levando ao estado de resistência da mesma forma. Acredita-se que esse seja um mecanismo adaptativo de estimulação do apetite, impedindo o indivíduo de morrer de inanição (BANKS et al., 2004).

Dentre as 36 novilhas utilizadas no estudo, uma, pertencente ao grupo tratado com leptina exógena, apresentou desenvolvimento de cisto ovariano, que não regrediu mesmo após a aplicação intramuscular de $PGF_{2\alpha}$. O cisto observado não apresentava mudanças cíclicas de tamanho e, após algumas semanas, passou a apresentar uma fina borda de maior ecogenicidade ao ultrassom, indicando luteinização e caracterizando um cisto luteínico (HAFEZ; HAFEZ, 2004). No entanto, as dosagens seriadas de progesterona sérica não mostraram aumento acima de 0,2 ng/ml na concentração do hormônio e as avaliações ultrassonográficas mostraram claro desenvolvimento de ondas foliculares, com presença de divergência folicular. Eventualmente, a novilha apresentou crescimento folicular seguido de ovulação no mesmo ovário onde era observada a presença do cisto. Entretanto, uma vez que tal condição pode ter alterado o processo normal de obtenção da puberdade, a novilha em questão foi excluída das análises.

Os cistos ovarianos são freqüentemente observados no gado leiteiro e em suínos, sendo raramente observada em bovinos de corte. Em bovinos, a formação desses cistos tem sido relacionada com elevada produção leiteira, modificações estacionais, predisposição hereditária e disfunção hipofisária (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O excesso de concentrado na dieta é considerado um fator predisponente ao desenvolvimento de cistos, ou seja, folículos

maiores que 2,5 cm de diâmetro que persistem por mais de 10 dias sem apresentar ovulação, assim como carências quantitativas e qualitativas de minerais e vitaminas (GRUNERT, 1989; NASCIMENTO, 1996). Segundo Webb & Armstrong (1998), além do fator nutricional, o estresse, com conseqüente aumento dos níveis de cortisol, também contribuem para a formação de cistos.

5.3 Consumo e Composição Corporal

Não foi observado efeito da administração de leptina (P>0,05) em nenhum dos parâmetros de carcaça avaliados (Tabela 6). As novilhas não foram abatidas necessariamente no dia da ovulação, como pode ser observado a partir dos dados de idade ao abate, uma vez que, em alguns casos, houve dúvidas na observação do CL ao ultrassom, sendo a ocorrência da ovulação confirmada apenas após a obtenção da dosagem de progesterona. No entanto, os animais do grupo A continuaram apresentando menor idade (722 ± 60, 774 ± 44 e 753 ± 68 dias nos grupos A, B e BL respectivamente) (P=0,0584) e maior ECC (6,0 ± 0,89 vs. 4,92 ± 0,23 e 4,82 ± 0,40 nos grupo B e BL respectivamente) (P<0,05) também no momento do abate, sendo que os grupos com menor consumo de energia não diferiram entre si (P>0,05). Desta forma, houve diferença entre PV à ovulação e PV ao abate, principalmente nos animais do grupo A, que apresentaram maior ganho de peso médio diário (358 ± 53 kg PV à ovulação vs. 392 ± 64 kg PV ao abate, 341 ± 20 kg PV à ovulação vs. 341 ± 21 kg PV ao abate e 336 ± 26 kg PV à ovulação vs. 334 ± 28 kg PV ao abate, para os grupos A, B e BL, respectivamente) (Tabelas 4 e 6).

Observou-se que a maior ingestão de energia determinou uma carcaça quente mais pesada ao abate (291 ± 36 kg no grupo A) (P<0,01), e provavelmente também à ovulação, quando comparada com os animais com baixo consumo de energia (182 ± 9 kg e 181 ± 17 kg para os grupos B e BL, respectivamente), que não diferiram entre si (P>0,05). O maior consumo de energia aumentou, também, a área de olho de lombo (59 ± 5 cm^2 vs. 52 ± 3 e 54 ± 5 cm^2 para os grupos A, B e BL respectivamente) e a espessura de gordura subcutânea (5,4 ± 2,6 mm vs. 3,3 ± 1,1 e 3,4 ± 1,5 mm para os grupos A, B e BL respectivamente) das novilhas do grupo A em relação aos outros dois grupos (P<0,01), que não diferiram entre si (P>0,05).

Também houve efeito de dieta nos dados de composição da carcaça, estimados a partir da análise do teor de água da seção HH ($P<0,01$), não sendo observado efeito da administração de leptina ($P>0,05$). O maior consumo de energia determinou carcaças com menor teor de água no corpo vazio (54,6 ± 3,8 % vs. 56,9 ± 1,8 e 58,0 ± 1,4 % nos grupos A, B e BL respectivamente), maior teor de MS (53,7 ± 5,8 % vs. 50,2 ± 2,7 e 48,5 ± 2,2 % nos grupos A, B e BL respectivamente), maior teor e EE (24,2 ± 4,9 % vs. 21,3 ± 2,3 e 19,9 ± 1,8 % nos grupos A, B e BL respectivamente), menor teor de proteína (16,4 ± 1,1 % vs. 17,1 ± 0,5 e 17,5 ± 0,4 % nos grupos A, B e BL respectivamente) e menor teor de MM (4,08 ± 0,28 % vs. 4,25 ± 0,13 e 4,34 ± 0,11 % nos grupos A, B e BL respectivamente). As novilhas do grupo A, apesar de apresentarem menor porcentagem de proteína no CVz, apresentaram maior AOL que as novilhas consumindo menor teor de energia.

A aparente discrepância entre os resultados pode ser explicada pelo fato de as novilhas do grupo A, devido ao maior consumo de energia, apresentarem crescimento mais acelerado que as novilhas dos grupos B e BL, além de menor idade à ovulação, sendo que animais mais jovens depositam mais proteína que animais mais velhos. Entretanto, o consumo de energia aumenta a deposição de gordura, resultando em maior EGS e redução da porcentagem de proteína no CVz, devido a um efeito de diluição, em relação a animais com baixo consumo de energia. Portanto, a maior porcentagem de EE e a menor porcentagem de proteína no corpo vazio das novilhas com maior consumo de energia, associada à maior EGS e AOL observadas, permite afirmar que, embora tenham ovulado com menor idade, as novilhas do grupo A apresentaram maior deposição de gordura na carcaça (Tabela 6).

Tabela 6 - Idade (Iab), peso vivo (PVab) e escore de condição corporal (ECCab) médios ao abate; peso de carcaça quente (PCQ); peso de carcaça fria (PCF); área de olho de lombo (AOL); espessura de gordura subcutânea (EGS); e proporção de água (H_2O CVz), matéria seca (MS CVz), extrato etéreo (EE CVz), proteína (Ptn CVz) e matéria mineral (MM CVz) no corpo vazio de novilhas zebuínas de acordo com os tratamentos

	Tratamento[1]					*P*[2]	
Variáveis	A	B	BL	Média	EPM[3]	Ef. Dieta[4]	Ef. Leptina[5]
Iab (dias)	722,09	774,25	752,91	750,47	10,28	0,0584	0,3814
PVab (kg)	392,05	340,63	334,55	355,29	8,23	0,0012	0,7289
ECCab	6,00[a]	4,92[b]	4,82[b]	5,24	0,13	-	-
PCQ (kg)[6]	221,91	182,25	181,18	194,74	5,03	<0,0001	0,9120
PCF (kg)	211,91	172,25	171,18	184,74	5,03	<0,0001	0,9120
AOL (cm^2)	59,09	51,75	53,73	54,76	0,94	0,0007	0,3138
EGS (mm)	5,45	3,33	3,45	4,06	0,35	0,0048	0,8763
H_2O CVz (%)	54,62	56,95	58,04	56,54	0,50	0,0053*	0,3271**
MS CVz (%)	53,71	50,18	48,51	50,80	0,77	0,0053*	0,3264**
EE CVz (%)	24,23	21,27	19,86	21,79	0,64	0,0053*	0,3256**
Ptn CVz (%)	16,44	17,14	17,47	17,01	0,15	0,0052*	0,3262**
MM CVz (%)	4,08	4,25	4,34	4,22	0,04	0,0053*	0,3270**

[1] A – dieta de alta energia, B – dieta de baixa energia, BL – dieta de baixa energia com aplicação de oLeptina (4,8 µg/kg PV); [2] Probabilidade de diferença estatística; [3] Erro Padrão da Média; [4] Efeito de dieta (contraste entre o tratamento A e os tratamentos B e BL); [5] Efeito da leptina (contraste entre os tratamentos B e BL); [6] Calculado como PCF (determinado no abatedouro) + peso da carretilha (6 kg) + perda de peso pelo frio (4 kg).

[a, b] Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis de 1 via (P<0,05).

* e ** os valores de P são semelhantes, pois os valores de MS CVz (%), EE CVz (%), Ptn CVz (%) e MM CVz (%) foram calculados, através de fórmulas, a partir da H_2O CVz (%).

Os principais componentes do corpo dos bovinos são água, gordura, proteínas e minerais, sendo a presença de carboidratos desconsiderada em razão de sua constância e baixo teor (REID et al., 1968). Observa-se que, durante o crescimento, os componentes químicos do corpo (água, proteína, gordura, matéria mineral) variam paralelamente à composição física (tecido muscular, tecido adiposo, tecido ósseo) (VÉRAS et al., 2001a). Os bovinos apresentam uma curva de crescimento do tipo sigmóide, com inclinação crescente do nascimento à puberdade, caracterizada por intensa deposição de proteínas, seguida por uma fase de desaceleração, caracterizada pela redução na deposição de proteína e aumento na deposição de gordura. De forma geral, animais mais jovens apresentam maior proporção de água e menor proporção de gordura corporal (FREITAS et al., 2006).

A determinação da composição corporal de bovinos permite identificar alterações no crescimento animal em função de diversos fatores, como raça, peso, sexo e composição da dieta, bem como avaliar o efeito de modificadores do metabolismo (HENRIQUE et al., 2003). O método direto de avaliação da composição corporal envolve a análise química do corpo vazio (CVz), ou seja, excluindo o conteúdo do trato gastrointestinal, bile e urina, método

trabalhoso e dispendioso, que exige a moagem de todos os tecidos do animal (PAULINO et al., 2006; LEME et al., 2000). Como alternativa, cada vez mais se tem utilizado métodos indiretos de estimativa da composição corporal, dentre os quais um dos mais difundidos é a análise da seção da 9ª-10ª-11ª costelas, ou seção HH, proposta por Hankins e Howe (1946). Diversos autores afirmam que é possível estimar com acuidade a composição corporal de bovinos a partir da seção HH (ALLEONI et al., 1997; VÉRAS et al., 2001a; GALATI et al., 2007), por outro lado, as equações propostas por Hankins e Howe (1946), foram desenvolvidas para animais taurinos, os quais apresentam padrão de deposição de gordura e proteína distinto dos zebuínos, e superestimam o teor de EE nos zebuínos (PAULINO et al., 2005; GOULART et al., 2006; LANNA, 1988; SILVA, 2001).

Marcondes et al. (2009), compararam a composição corporal e de carcaça de machos inteiros, machos castrados e fêmeas da raça Nelore, obtidas pelo método tradicional (direto) ou pela análise da seção HH e observaram que as equações de Hankins e Howe (1946) subestimaram a quantidade de tecido muscular desses animais em 8,8% e de tecido adiposo em 37,45%. Ainda assim, a análise da seção HH é uma alternativa promissora, porém equações específicas para raça e categoria animal precisam ser desenvolvidas e validade nas condições brasileiras (MARCONDES et al., 2009). Algumas pesquisas no Brasil já estão sendo realizadas neste sentido.

A gordura e a água são os componentes mais variáveis do corpo do animal, enquanto a proteína e os minerais se mantêm constantes. Considerando animais pertencentes à mesma raça e com peso de corpo vazio (PCVz) equivalente, observa-se que as fêmeas têm maior quantidade de gordura corporal que machos castrados, e estes mais que machos inteiros (LANNA et al., 1992; BORGES, 2000). Além disso, segundo Reid et al. (1963), a relação entre gordura e água em bovinos não é afetada pela idade, tipo de animal (corte ou leite) e sexo. Baseado nestas informações optou-se pela estimativa da composição corporal a partir da determinação da água na seção HH, utilizando equações desenvolvidas por Lanna (1988), e citadas por Putrino (2006); Leme (1993) e Leme et al. (1994), e validadas para novilhos castrados, uma vez que os machos castrados apresentam composição corporal mais próxima à das fêmeas, que machos inteiros. Uma vez que ainda não há equações validadas para estimar a composição corporal de novilhas a partir da seção HH e considerando as afirmações acima, a utilização dessas equações pode levar à estimativas aceitáveis, no presente estudo, entretanto, os dados apresentados na Tabela 7, devem ser observados com cautela e utilizados apenas para comparações entre os grupos experimentais deste trabalho.

Vários autores relataram aumento na deposição de gordura em novilhas, com o aproximar da puberdade, sendo esse processo acelerado pelo aumento no consumo de energia (HALL et al, 1995). Hall et al. (1995), avaliando novilhas de 8 meses de idade e média de 220 kg PV, recebendo dieta formulada para alto ou moderado GMD (1,0 kg PV/dia ou 0,6 kg PV/dia), observaram que os animais em alto ganho entraram em puberdade cerca de 42,7 dias mais cedo e apresentaram maior ECC, AOL, EGS e marmoreio, além de carcaça mais pesada (P<0,01). Estudos anteriores já haviam demonstrado que o maior consumo de nutrientes, principalmente energia, aumenta o tamanho e a adiposidade corporal (ARIJE; WILTBANK, 1971; McSHANE et al., 1989a; HALL et al., 1994). Hopper et al. (1993), avaliando novilhas com GMD de de 0,5 kg ou 1,0 kg PV/dia, relatam uma tendência dos animais em maior ganho de entrarem em puberdade mais jovens (P<0,011). O maior GMD determinou maior PV e EGS à puberdade, mas não alterou os outros componentes da carcaça. Os autores afirmam que a diferença no GMD entre os dois grupos pode não ter sido suficiente para alterar a idade e as outras variáveis de composição de carcaça à puberdade.

Os resultados médios obtidos para novilhas Nelore à puberdade, neste experimento (Tabela 7), são muito semelhantes aos relatados por Alleoni et al. (1997) (57,5 % de água, 21,2 % de EE, 17,1 % de proteína e 4,2 % de cinzas no CVz) e Goulart (2006) (55,5 % de água, 22,3 % de EE, 17,8 % de PB e 4,4 % de cinzas no CVz), ao avaliarem a composição corporal de novilhos Nelore castrados a partir da seção HH.

Entretanto, comparando os dados de composição das novilhas com maior consumo de energia (grupo A), com os dados obtidos por Leme (1993), em novilhos Nelore castrados alimentados *ad libitum,* com média de 26 meses e 423 kg PV, observa-se maior teor de água (58,1 % vs. 54,62 %) e proteína (17,49 % vs. 16,44 %), e menor teor de EE (20,02 % vs. 24,23 % a 18,01 %) no CVz dos machos castrados, quando comparados com as fêmeas em mesmo estágio de desenvolvimento, sendo que o teor de matéria mineral foi semelhante (4,34 % vs. 4,08% para machos e fêmeas respectivamente), o que está de acordo com a observação de que fêmeas apresentam maior deposição de gordura corporal em relação aos machos, que, apesar de castrados, tendem a depositar mais proteínas. Galati et al. (2007), avaliando o composição corporal de novilhos Nelore a partir da determinação da quantidade de água no CVz pelo método do deutério, observaram 53,7 % de água, 25,0 % de EE, 17,9 % de proteínas e 3,4 % de cinzas, também diferindo principalmente quanto à proporção de água e EE, dos valores apresentados na tabela 7 para novilhas.

Paulino (2006) avaliou a composição corporal física e química, através de abate comparativo (método direto), de fêmeas da raça Nelore com média de 24 meses de idade e

296,4 ± 6,3 kg, recebendo 0,6 ou 1,2 % do PV de concentrado e observaram 15,39 % de proteína, 22,86 % de EE, 56,13 % de água e 5,62% de cinzas na carcaça desses animais. A comparação dos dados de composição corporal do presente experimento com os dados de literatura é bastante difícil, uma vez que há muito poucos trabalhos avaliando tais parâmetros em novilhas.

Fortin et al. (1980) e Reid et al. (1980) afirmaram que o peso do corpo vazio é a variável que mais influencia a composição corporal dentro da mesma raça bovina. Assim como no presente experimento, Leme (1993) também observou efeito da dieta na composição corporal de bovinos, sendo que o aumento na ingestão de energia e no GMD determinou maior deposição de gordura. Delavaud et al. (2000) demonstraram, em ovelhas, que a quantidade de tecido adiposo e o status nutricional explicam 35 e 17% da variação na concentração sérica de leptina, respectivamente, enquanto Ehrhardt et al. (2000) observaram que o ECC responde por 37% da variação na leptina sérica em vacas em lactação. Em estudo posterior, Delavaud et al. (2002) observaram que a concentração sérica de leptina era significativamente menor em vacas Holandesas com baixo ECC (1,3 ± 0,1), quando comparada com vacas com alto ECC (3,8 ± 0,1) (P<0,05), em escala de 0 a 5.

A partir de tais observações, sugere-se que, apesar de não haver diferença no PV à ovulação entre os grupos de alta ou baixa ingestão de energia na dieta (Tabela 4), o maior GMD das novilhas do grupo A determinou maior taxa de deposição de gordura corporal, levando a um maior ECC em idade inferior e determinando um aumento acelerado nos níveis de leptina endógena nesses animais, o que provavelmente resultou no adiantamento da puberdade das novilhas do grupo A em relação aos grupos B e BL. As novilhas com menor ingestão de energia, portanto, provavelmente levaram mais tempo para alcançar o nível mínimo de leptina necessário para permitir o aparecimento da puberdade, que foi obtida com menor ECC, uma vez que apresentaram menor GMD e, conseqüentemente, menor taxa de deposição de gordura corporal. Da mesma forma, Frisch et al. (1975) analisaram a composição da carcaça de ratos e demonstraram que, apesar de apresentarem menor PV, os indivíduos recebendo dieta rica em energia apresentaram maior teor de gordura corporal no momento da puberdade.

Outros autores observaram que a leptina sérica também é positivamente relacionada com a espessura de gordura subcutânea no músculo *Longissimus dorsi* (EGS) e com o grau de marmoreio (MINTON et al., 1998; TOKUDA et al., 1999), o que está de acordo com os resultados obtidos no presente experimento, que também demonstrou maior EGS nos animais com maior consumo de energia e menor idade à puberdade.

Por outro lado, Brooks et al. (1985), trabalhando com 131 novilhas de corte recebendo 3 níveis de energia na dieta, observaram diferença no PV e % de gordura na puberdade de acordo com as dietas (p<0,01), mas não observaram diferença na idade à puberdade. Segundo os autores, os altos coeficientes de determinação (R^2) obtidos nas análises de regressão indicaram que as estimativas de composição corporal são úteis para a predição do PV à puberdade em novilhas de corte, mas não suportam a hipótese do PV ou massa de gordura crítica para a obtenção da puberdade. Os autores afirmam, ainda, que os fatores ambientais exercem maior influência que os nutricionais na puberdade de novilhas de corte.

Houve diferença na produção total diária de MS fecal (MSF), estimada através do indicador óxido de cromo (Tabela 7). O grupo com alto consumo de energia produziu menor quantidade diária de fezes (2,25 ± 0,21 kg MS/dia; *P*<0,05), quando comparado com os grupos com menor consumo de energia (2,78 ± 0,14 e 2,66 ± 0,10 kg MS/dia para os grupos B e BL respectivamente), os quais não diferiram entre si (*P*>0,05). A digestibilidade aparente das dietas foi maior para o grupo recebendo alto teor de energia (58,00 ± 4,80 % vs. 49,50 ± 1,73 % e 49,54 ± 2,36 % para os grupos B e BL respectivamente; *P*<0,01), uma vez que as novilhas em restrição de energia receberam uma proporção significativa de bagaço de cana *in nautura* na dieta, com o intuito de limitar o consumo do nutriente. Não houve efeito nem de dieta, nem da administração de leptina exógena, no consumo médio individual de MS por tratamento, estimado através dos indicadores óxido de cromo e FDNi (5,37 ± 1,58, 5,49 ± 0,85 e 5,27 ± 0,66 kg MS/dia para os grupos A, B e BL respectivamente; *P*>0,05) ou no consumo de energia bruta (23,21 ± 6,84, 23,13 ± 3,56 e 22,18 ± 2,80 Mcal/dia; *P*>0,05). Devido à maior digestibilidade aparente da dieta mais energética, as novilhas do grupo A apresentaram maior consumo de energia digestível (13,48 ± 4,34 Mcal/dia; *P*<0,05) que as do grupo de baixo teor de energia, que não diferiram entre si (11,44 ± 1,67 e 11,00 ± 1,56 Mcal/dia para os grupos B e BL respectivamente; *P*>0,05). Da mesma forma, as novilhas do grupo A apresentaram maior consumo de energia metabolizável (11,06 ± 3,56 vs. 9,38 ± 1,37 e 9,02 ± 1,28 Mcal/dia para os grupos A, B e BL respectivamente; *P*>0,05), de energia líquida de ganho (3,43 ± ; 1,80 ± e 1,74 ± Mcal/dia para os grupos A, B e BL respectivamente; *P*>0,05) e de NDT (3,06 ± 0,99 vs. 2,60 ± 0,38 e 2,50 ± 0,35 Mcal/dia para os grupos A, B e BL respectivamente; *P*>0,05), sendo os grupos B e BL não apresentaram diferença significativa (*P*>0,05) (Tabela 7). O grupo com maior consumo de energia apresentou, também melhor eficiência de ganho (0,25 ± vs. 0,16 ± para os grupos com baixo consumo de energia, *P*<0,01). O maior consumo de NDT, energia digestível e metabolizável justificam o

maior GMD apresentados pelas novilhas do grupo A, apesar de o CMS e de energia bruta não ter diferido entre os grupos.

Tabela 7 - Produção total de fezes (MSF), digestibilidade da dieta (Digest), consumo individual médio de matéria seca (CMS), consumo de energia bruta (CEB), consumo de energia digestível (CED), consumo de energia metabolizável (CEM), consumo de energia líquida de ganho (CELg), consumo de NDT (CNDT) e eficiência de conversão de energia para ganho por tratamento

	Tratamento[1]					*P*[2]	
Variáveis	A	B	BL	Média	EPM[3]	Ef. Dieta[4]	Ef. Leptina[5]
MSF (kg MS/dia)	2,25	2,78	2,66	2,56	0,096	0,0215	0,5882
Digest (%)	58,00	49,50	49,54	52,35	0,893	<0,0001	0,9798
CMS (kg/dia)	5,37	5,49	5,27	5,38	0,187	0,9846	0,6361
CMS (% PV)	1,69	2,27	2,18	2,05	0,078	0,0007	0,5728
CEB (Mcal/dia)[6]	23,21	23,13	22,18	22,84	0,08	0,7521	0,6422
CED (Mcal/dia)[7]	13,48	11,44	11,00	11,97	0,51	0,0383	0,7184
CEM (Mcal/dia)[8]	11,06	9,38	9,02	9,82	0,42	0,0384	0,7178
CELg (Mcal/dia)[9]	3,43	1,80	1,74	2,32	0,21	<0,0001	0,8905
CNDT (kg/dia)[10]	3,06	2,60	2,50	2,72	0,12	0,0388	0,7159
Eficiência[11]	0,25	0,16	0,16	0,19	0,01	<0,0001	0,9464

[1] A – dieta de alta energia, B – dieta de baixa energia, BL – dieta de baixa energia com aplicação de oLeptina (4,8 µg/kg PV); [2] Probabilidade de diferença estatística; [3] Erro Padrão da Média; [4] Efeito de dieta (contraste entre o tratamento A e os tratamentos B e BL); [5] Efeito da leptina (contraste entre os tratamentos B e BL).
[6] CEB = EB dieta (Mcal/kg MS)/CMS (kg/dia)
[7] CED = ED dieta (Mcal/kg MS)/CMS (kg/dia), onde ED dieta = EB*Digest
[8] CEM = EM dieta (Mcal/kg MS)/CMS (kg/dia), onde EM = ED*0,82
[9] CELg = ELg dieta (Mcal/kg MS)/CMS (kg/dia), onde ELg = $1,42*EM - 0,174*EM^2 + 0,0122*EM^3$ (NRC, 1996)
[10] CNDT = CED/4,4 (NRC, 1996)
[11] Eficiência de ganho = CELg/CED

O efeito da nutrição na idade à puberdade de novilhas de corte é mediado por alterações na composição corporal (FRISCH, 1984) e em sinais metabólicos (STEINER et al., 1983). A idade à puberdade é influenciada pela taxa de crescimento (SCHILLO et al., 1992; YELICH et al., 1995) e o consumo de energia está positivamente relacionado com essa taxa de crescimento e inversamente relacionado com a idade à puberdade (WILTBANK et al., 1969; ARIJE; WILTBANK, 1971; McSHANE et al., 1989).

Kennedy (1953) sugeriu a hipótese da regulação lipostática da massa de gordura corporal através de um mecanismo de feedback negativo sobre a ingestão de alimentos, o qual ocorreria com a participação de um sinalizador circulante, secretado proporcionalmente ao grau de adiposidade. Acredita-se que a leptina seja um desses sinalizadores, uma vez que é expressa por adipócitos (COLLINS et al., 1996), está linearmente relacionada com a massa de tecido adiposo (CONSIDINE et al., 1996) e possui receptores específicos nas áreas do sistema

nervoso central, principalmente do hipotálamo, responsáveis pelo controle da saciedade, como neurônios contendo NPY, POMC, CART e outros (CUNNINGHAM et al., 1999; IQBAL et al., 2001). Observa-se que lesões nos núcleos ventromedial, paraventricular e dorsomedial do hipotálamo produzem apetite incontrolável e obesidade, enquanto que lesões no hipotálamo lateral causam anorexia (MATTERI, 2001). Em geral, a leptina reduz a expressão de estimuladores hipotalâmicos do apetite e induz a expressão de neurohormônios supressores do apetite (KALRA et al., 1999).

O controle do consumo ocorre também perifericamente, durante a ingestão de alimentos, através de peptídeos gastrointestinais sinalizadores da saciedade, como a colecistoquinina (CCK) e o glucagon (SMITH, 1996). A CCK é secretada pelo intestino delgado em resposta à ingestão de alimentos. Barrachina et al. (1997) demonstraram um claro sinergismo funcional entre leptina e CCK, levando à redução do consumo em camundongos. Yonekura et al. (2002) demonstraram que há expressão de leptina e receptores de CCK no rúmen, abomaso e intestino delgado de bezerros lactentes e que, após o desenvolvimento do rúmen devido às alterações nutricionais observada após a desmama, a expressão de leptina e receptores de CCK passa a ser observada apenas no intestino delgado (THIVEND et al., 1980).

Vários estudos demonstram que a administração de leptina suprime o consumo alimentar (BARB et al., 1998; HENRY et al., 1999). Eckel et al. (1998) trataram ratas sexualmente maduras com 4 mg de leptina/kg e observaram redução duradoura no PV e redução de aproximadamente 20% no consumo alimentar. Emilsson et al. (1999) demonstraram que a aplicação intraperitoneal de 1,5 mg de leptina/kg PV reduziu o consumo alimentar de camundongos normais em 26% e em 35% nos indivíduos obesos, havendo redução também do PV nos dois grupos. Chehab et al. (1997), tratando camundongas normais pré-púberes com leptina recombinante humana observaram acentuada redução no consumo alimentar ($P<0,001$), resultando em redução de 13% do PV dos animais tratados em relação aos não tratados ($P<0,01$), porém houve aumento no peso dos órgãos reprodutivos em 53, 37,5 e 43,8% para útero, ovários e ovidutos, respectivamente, em comparação aos animais controle. Morrison et al. (2001) demonstraram que a administração central de leptina reduz o consumo alimentar de cordeiras em dieta de mantença ($P<0,01$), mas não tem efeito quando os animais são alimentados abaixo da mantença. Henry et al. (1999) também observaram redução no consumo de ovelhas tratadas, o que estava associado com uma redução na expressão de RNAm de NPY no hipotálamo.

Barash et al. (1996) avaliaram o efeito da administração intraperitoneal de 50 µg de leptina recombinante humana, duas vezes ao dia, por 14 dias, em camundongas obesas *ob/ob* alimentadas *ad libitum* ou em restrição alimentar. A administração de leptina determinou redução de 17% no PV dos animais tratados em relação ao grupo controle, elevação dos níveis séricos de LH e aumento do peso dos ovários e do útero. O no número de folículos ovarianos primários e de Graaf também aumentou significativamente (P<0,05), demonstrando que, apesar de reduzir o consumo alimentar e o PV, a leptina estimulou o sistema reprodutivo dos camundongos *ob/ob*.

Ao contrário dos dados de literatura, o presente experimento não demonstrou redução no consumo das novilhas tratadas com leptina exógena. As interações entre as vias de apetite e saciedade são bastante complexas e ainda não são totalmente compreendidas, mas sabe-se que a ausência de um dos fatores reguladores é compensada por alterações nos demais fatores, mantendo a ingestão de alimentos em um nível adequado (MATTERI, 2001).

Schneider et al. (2001) afirmam que o emprego da leptina como tratamento, a longo-prazo, de fertilidade em animais de produção é limitado, uma vez que o hormônio aumenta o gasto de energia e inibe o consumo alimentar. Entretanto, a maioria dos estudos disponíveis na literatura foram realizados em humanos e roedores, ou em cultura de células *in vitro,*de forma que os resultados ainda são muito conflitantes, principalmente em relação aos ruminantes. Desta forma, mais estudos são necessários para elucidar se a leptina, particularmente em baixas doses, pode acelerar a puberdade e aumentar o número de ovulações dos animais de produção.

6 CONCLUSÕES

A administração de leptina exógena não adiantou a obtenção da puberdade em novilhas zebuínas com baixo consumo de energia, porém aumentou, temporariamente, a taxa de crescimento dos folículos ovarianos.

O estímulo do desenvolvimento folicular pela administração crônica de leptina, ainda que temporário, permite especular que uma dosagem inadequada tenha resultado em desenvolvimento de um quadro de resistência à leptina. É possível que a utilização de menor dosagem evidenciasse o efeito da leptina na puberdade desses animais.

A aplicação de leptina exógena a longo-prazo não reduziu o consumo de alimentos, no entanto, em decorrência da aparente inadequação da dose de leptina utilizada, não se pode fazer nenhuma afirmação quanto a seus efeitos no consumo alimentar.

O maior consumo de energia na dieta acelerou a taxa de crescimento folicular, a puberdade e elevou a concentração de gordura corporal de novilhas zebuínas à puberdade.

REFERÊNCIAS

ADAMS G. P.; MATTERI R.L., GINTHER O.J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers, **Journal Reproduction Fertility.** v.96, n.2, p.627-40, 1992.

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

AGARWAL, S.K.; VOGEL, K.; WEITSMAN, S.R.; MAGOFFIN D.A. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary**. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 3, p. 1072-1076, 1999.

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, n. 3, p. 391–395, 1997.

AHIMA, R.S.; PRABAKARAN, D.; MANTZOROS, C.; QU, D.; LOWELL, B.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J.S. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature,** v. 382, n. 6588, p. 250–252, 1996.

ALLEONI, G.F.; LEME, P.R.; BOIN, C. Avaliação da composição química e física dos cortes da costela para estimar a composição química corporal de novilhos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v. 26, n. 2, p. 382-390, 1997.

ALMOG, B.; GOLD, R.; TAJIMA, K.; DANTES, A.; SALIM, K.; RUBINSTEIN, M.; BARKAN, D.; HOMBURG, R.; LESSING, J.B.; NEVO, N.; GERTLER, A.; AMSTERDAM, A. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. **Molecular and Cellular Endocrinology,** v. 183, n. 1-2, p. 179-191, 2001.

ALOI J.A.; BERGENDAHL, M.; IRANMANESH, A.; VELDHUIS J.D. Pulsatile intravenous gonadotropin-releasing hormone administration averts fasting-induced hypogonadotropism and hypoandrogenemia in healthy, normal weight men. **Journal Clinical Endocrinol Metabism.** V.82, n.5, p.1543-8, 1997.

AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1555-1561, 2002.

AMSTALDEN, M.; ZIEBA, D.A.; EDWARDS, J.F.; HARMS, P.G.; WELSH, T.H.; STANKO, R.L.; WILLIAMS, G.L. Leptin acts at the bovine adenohypophysis to enhance basal and gonadotropin-releasing hormone-mediated release of luteinizing hormone:

Differential effects are dependent upon nutritional history. Biology of Reproduction, v. 69, n. 5, p. 1539-1544, 2003.

AMSTALDEN, M.;. GARCIA, M.R; WILLIAMS, S.W.; STANKO, .L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS G.L**.** Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I. **Biology of Reproduction,** v. 63, n. 1, p. 127-133, 2000.

AMSTERDAM A, SELVARAJ N. Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. **Endocrinology Review**. v.18, n.4, p.435-61, 1997.

ARIJE G.F; WILTBANK J.N. Age and weight at puberty in Hereford heifers. **. Journal Animal Science.** V.33, n.2, p. 401-6, 1971.

AUBERT , M.L, PIERROZ , D. D.; GRUAZ, N. M. GRUAZ. Metabolic control of sexual function and growth: Role of neuropeptide Y and leptin **Molecular and Cellular Endocrinology** ,V.140, N. 1, P. 107-113, 1998.

AUSTIN E.J.; MIHM M.; EVANS A.C.; KNIGHT P.G.; IRELAND J.L.; IRELAND J.J.; ROCHE J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biology Reproduction.** 2001 v. 64, n.3,p.839-48, 2001.

BADGER , T.M.; LYNCH, E.A.; FOX P.H. Effects of fasting on luteinizing hormone dynamics in the male rat, **Journal Nutrition**, v.115, n.6 p.788-97, 1985.

BANKS A.S, ; DAVIS S. M.; BATES S.H. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor**. Journal Biology Chemical.** v.12, n.19, p.14563-72, 2000.

BARASH, I.A.; CHEUNG, C.C.; WEIGLE, D.S.; REN, H.; KABIGTING, E.B.; KUIJPER, J.L.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology, .** v. 137, n. 7, p. 3144–3147, 1996.

BARB C.R.; KRAELING, R.R.; RAMPACEK, G.B. Opioid modulation of gonadotropin and prolactin secretion in domestic farm animals. **Domest Anim Endocrinol.** v. 08, n. 0115-27, 1991.

BARB, C. R.; YAN, X.; AZAIN, M. J. ; KRAELING, R. R. ; RAMPACEK, G. B.; RAMSAY **,** T. G. Recombinant Porcine Leptin Reduces Feed Intake and Stimulates Growth Hormone Secretion in Swine **Domestic Animal Endocrinology**, v.*15,n. 1*, p. 77-86, 1998.

BARB, C.R . The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 5, 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, n. 1, p 47-63, 2001b

CAMERON, J.L, KOERKER DJ, STEINER RA. Metabolic changes during maturation of male monkeys: possible signals for onset of puberty. **American Journal of Physiology.** v.249, n.4, p.385-391, 1985.

BARB, C.R.; HAUSMAN, G.J.; HOUSEKNECHT, K. Biology of leptin in the pig Domestic. **Animal Endocrinology,** v. 21, n. 4, p. 297-317, 2001a.

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 Animal Science**, v.75, n 03, p.781-790, 1997.

BARB, C.R.; KRAELING, R.R. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. **Animal Reproduction Science,** v. 82-83, p. 155-167, 2004.

BARKAN, D.; JIA, H.; DANTES, A.; VARDIMON, L.; AMSTERDAM, A.; RUBINSTEIN, M. Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. **Endocrinology,** v. 140, n. 4, p. 1731-1738, 1999.

BARRACHINA M.D.; MARTÍNEZ V.; WANG L., WEI J.Y., TACHÉ Y. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. **Procedings Natl Academic Science U S A.** v.16, n.19, p.10455-60, 1997.

BARROSO, G.; BARRIONUEVO, M.; RAO, P.; GRAHAM, L.; DANFORTH, D.; HUEY, S.; ABUHAMAD, A.; OEHNINGER , S. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients, **Fertility and Sterility**, v.*72,n. 6*, p. 1024-1026, 1999.

BELTRAN, M.P. **Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2007. 106 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

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

BERGMANN, J.A.G. Indicadores de precocidade sexual em bovinos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS, 1998, Uberaba. **Anais...** Uberaba: Associação Brasileira dos Criadores de Zebu, 1998.p.145-155.

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

BERGMANN, J.A.G.; ZAMBORLINI, L.C.; PROCÓPIO, C.S.O.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R. Estimativas de parâmetros genéticos do perímetro escrotal e do peso corporal em animais da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 48, n. 1, p. 69-78, 1996.

BILLIG H, FURUTA I, HSUEH A. J. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis, **Endocrinology.** v. 133, n.5, p. 2204-12, 1993.

BJØRBAEK C,; EL-HASCHIMI K,; FRANTZ J.D,; FLIER J.S. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. **Journal Biology Chemical.** v.15, n.42, p.30059-65, 1999.

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, n. 4, p. 619-625, 1998.

Bjørbæk, C.; Kahn, B.B. Leptin Signaling in the Central Nervous System and the Periphery **Recent Progress in Hormone Research** v.59,p.305-331, 2004.

BLANK, J. L., DESJARDINS C. Differential effects of food restriction on pituitary-testicular function in mice. **American Journal Physiology, v.** 248, p.181-9, 1985.

BOCQUIER F.; BONNET M.;FAULCONNIER Y.; GUERRE-MILLO M.; MARTIN P.; CHILLIARD Y. Effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe**. Reproduction Nutrition Dev. V.**38, n.5, p.489-98, 1998.

BOLAND M.P.;LONERGAN P.; O'CALLAGHAN D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development , **Theriogenology**, V.55, N.6, p. 1323-1340.2001.

BOSSIS I.; WETTEMANN, R.P.; WELTY S.D.; VIZCARRA J.A.; SPICER L.J.; DISKIN M.G. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation, **Journal Animal Science.** v.77, n.6, p.1536-46, 1999.

BRANNIAN, J.D.; ZHAO, Y.; MCELROY, M. Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. **Human Reproduction,** v. 14, n. 6, p. 1445-1448, 1999.

BRONSON, F.H. Effect of food manipulation on the GnRH-LH-estradiol axis of young female rats. American Journal of Physiology, v. 4, p. 616-621, 1988.

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, n. 6, p. 2483-2487, 1986.

BRONSON, F.H. Puberty in female mice is not associated with increases in either body fat or leptin. **Endocrinology,** v. 142, p. 4758-4761, 2001.

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

BROOKS A.L.; MORROW R.E; YOUNGQUIST R.S. Body composition of beef heifers at puberty. **Theriogenology.** V.24, n.2, p.235-50, 1985.

BUTZOW, T.L.; MOILANEN, J.M.; LEHTOVIRTA M, T.T.; HOVATTA, O.; SIEGBERG, R.; NILSSON, C.G.; APTER, D. Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 84, p. 3135-3139, 1999.

CAGAMPANG F.R.; MAEDA K, YOKOYAMA A, OTA K. Effect of food deprivation on the pulsatile LH release in the cycling and ovariectomized female rat. **Horm Metab Res. v.**22, n. 5, p. 269-72, 1990.

CAMERON , J.L.; NOSBISCH, C. Suppression of Pulsatile Luteinizing Hormone and Testosterone Secretion during Short Term Food Restriction in the Adult Male Rhesus Monkey (Macaca mulatta) **Endocrinology**, v.128, p.1532 – 1540, 1991.

CAMERON, J.L. Metabolic cues for the onset of puberty. **Endocrinology of Puberty,** v. 36, n. 3-4, p. , 1991.

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, n. 5223, p. 546–549, 1995.

CANNADY, W.E.; BRANN, D. W. ; MAHESH, V. B. The potential role of periovarian fat and leptin in initiation of puberty in the immature rat. **International Journal of Obesity,** n.24, p.146-S147, 2000.

CASALI, A. O. **Procedimentos metodologicos *insitu* na avaliação do teor de compostos indigestiveis em alimentos e fezes de bovinos.** 2006, 47 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CHEHAB, F.F.; LIM, M.E.; LU, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nature Genetics,** v. 12, n. 3, p. 318–320, 1996.

CHEHAB, F.F.; MOUNZIH, K.; LU, R.; LIM, M.E. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. **Science,** v. 275, n. 5296, p. 88–90, 1997.

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, n. 2, 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.

CICCIOLI, N.H.; CHARLES-EDWARDS, S.L.; FLOYD, C.; WETTEMANN, R.P; PURVIS, H.T.; LUSBY, K.S.; HORN, G.W.; LALMAN, D.L. Incidence of puberty in beef heifers fed high- or low-starch diets for different periods before breeding. **Journal of Animal Science,** v. 83, n. 11, p. 2653-2662, 2005.

CIOFFI J.A.; VAN BLERKOM J.; ANTCZAK M.; SHAFER A.; WITTMER S.; SNODGRASS H.R. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles, **Molecular Human Reproduction.,** v.3, n.6, p.467-72, 1997.

CLAYTON, P E.; TRUEMAN, J A**.** Leptin and puberty. **Arch. Dis. Child**., v. 83, n. 1, p. 1-4, 2000.

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. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **New England Journal of Medicine, v.**1, n.5, p. 292–295, 1996.

CUNNINGHAM, M.J.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 216-222, 1999.

DAY ET AL. (1984) - DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; GARCIA-WINDER, M.;ZALESKY, D.D.;, SCHANBACHER, B.D.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. Biology of Reproduction, v. 31, n. 2, p. 332-341, 1984.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. Biology of Reproduction, v. 37, n. 5, p. 1054-1065, 1987.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; ZALESKY, D.D.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Effects of restriction 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, n. 2, p. 1641-1648, 1986.

DE MATTEIS, R.; CINTI, S. Ultrastructural immunolocalization of leptin receptor in mouse brain. **Neuroendocrinology,** v. 68, p. 421-429, 1998.

DELAVAUD,C.; BOCQUIER, F.; CHILLIARD, Y.; KEISLER, D.H.; GERTLER, A.; KANN, G. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. **Journal of Endocrinology,** v. 165, n. 2, p. 519-526, 2000.

DELAVAUD,C.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y.; BOCQUIER, F.; KANN, G.; CHILLIARD, Y. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 5, p. 1317-1328, 2002.

DICKERMAN R.W.; LI, H.Y.; WADE, G.N. Decreased availability of metabolic fuels suppresses estrous behavior in Syrian hamsters, **American Journal Physiology ,** 1993 , v.264, n. 3 p. 568-72, 1993.

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

DUGGAL, P. S.; RYAN N.K.; VAN DER HOEK K. H, RITTER L.J. ARMSTRONG D. T, MAGOFFIN D. A.; NORMAN R.J. Effects of leptin administration and feed restriction on thecal leucocytes in the preovulatory rat ovary and the effects of leptin on meiotic maturation, granulosa cell proliferation, steroid hormone and PGE2 release in cultured rat ovarian follicles, **Reproduction**., v. 123, n.6, p. 891-8, 2002.

DUGGAL, P.S.; VAN DER HOEK, K.H.; MILNER, C.R.; RYAN, N.K.; ARMSTRONG, D.T.; MAGOFFIN, D.A.; NORMAN, R.J. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. **Endocrinology**, v. 141, n. 6, p. 1971-1976, 2000.

DYER, C.J.; SIMMONS, J.M.; MATTERI, 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, n. 2, p. 119-128, 1997

EBLING F.J.; WOOD R.I.; KARSCH F.J.; VANNERSON L.A.;SUTTIE J.M, BUCHOLTZ D.C.; SCHALL R.E, FOSTER D.L Metabolic interfaces between growth and reproduction. III. Central mechanisms controlling pulsatile luteinizing hormone secretion in the nutritionally growth-limited female lamb **Endocrinology. v.**126, n.5, p.2719-27 1990.

EBLING, F.J.P.The neuroendocrine timing of puberty. **Reproduction,** v. 129, n. 6, p. 675 – 683, 2005.

EHRHARDT, R.A.; SLEPETIS, R.M.; SIEGAL-WILLOTT, J.; VAN AMBURGH, M.E.; BELL, A.W.; BOISCLAIR, Y.R.J. Development of a specific radioimmunoassay to measure

physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. **Endocrinology**, v. 166, n. 3, p. 519-528, 2000.

ELER J.P.; SILVA J.A.; FERRAZ J.B, DIAS F.; OLIVEIRA H.N.; EVANS J.L.; GOLDEN B.L Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nellore heifers **Journal Animal Science.** v.80, n.4, p.951-4, 2002.

ELMQUIST, J.K.; BJØRBÆK, C.; AHIMA, R.S.; FLIER, J.S.; SAPER, C.B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology,** v. 395, n. 4, p. 535–547, 1998.

EMILSSON, V.; ARCH, J.R.S.; GROOT, R.P. DE; LISTER, C.A.; CAWTHORNE, M.A. Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. **FEBS Letters**, v. 455, n. 1, p. 170-174, 1999.

EVANS, A.C.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age**. Journal of Reproduction and Fertility,** v. 102, n. 2, p. 463-470, 1994.

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.

FAROOQI, IS, et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. **New Engand Journal of Medicine**, v. 341, p. 879-884, 1999.

FINN, P.D.; CUNNINGHAM, M.J.; PAU, K.Y.F.; SPIES, H.G.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. **Endicrinology,** v. 139, n. 11, p. 4652-4662, 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, n.1, p.375-81, 1985.

FOSTER D.L,; RYAN K.D.Endocrine mechanisms governing transition into adulthood in female sheep**. Journal Reproduction Fertility Suppl.** v. 30, p.75-90, 1981.

FOSTER, D. L.; EBLING, F. J. P.; . MICKA, A. F.; VANNERSON, L. A.; BUCHOLTZ D. C.; WOOD, R. I.; SUTTIE, J. M., FENNER, D. E**.** Metabolic Interfaces between Growth and Reproduction. I. Nutritional Modulation of Gonadotropin, Prolactin, and Growth Hormone Secretion in the Growth-Limited Female Lamb**, Endocrinology,** v.125, p.342 – 350, 1989.

FOSTER, D.L.; NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. **Biology of Reproduction,** v. 60, n. 2, p. 205-215, 1999.

FREITAS, J.A.; QUEIROZ, A.C.; DUTRA, A. R. Composição do ganho e exigências de energia e proteína para ganho de peso em bovinos Nelore puros e mestiços. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v. 35, n. 3, p. 886-893, 2006.

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

FRISCH , R. E. Body fat, puberty and fertility. **Biol Rev Camb Phil Soc**, v. 59, n. 2, p 161–188, 1984.

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, llean body weight and fat. **Humam Biology.** v.45, n.3, P.469-83, 1973.

FRISCH, R. E.; HEGSTED, D. M.; YOSHINAGA, K. Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. **Proceedings of the National Academy of Sciences**

FRISCH, R. E.; JANET W.; McArthur Menstrual Cycles: Fatness as a Determinant of Minimum Weight for Height Necessary for Their Maintenance or Onset **. Science**. v.185, n. 4155, p. 949 – 951, 1974.

FRISCH, R.E. The right weight: body fat, menarche and fertility, **Proceedings of the Nutrition Society,** v.53, n.1, p.113-29, 1994.

FRISCH, R.E.; WYSHAK, G.; VINCENT L. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. **New England Journal of Medicine,** v. 3003, p. 17-9, 1980.

GALATI, R.L.; EZEQUIEL, J.M.B.; SILVA, O.G.C. et al. Equações de predição da composição química corporal a partir do corte da 9-10-11a costelas de bovinos castrados Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.480-488, 2007.

GALINA, C.; PIMENTEL, C.A.; NEVES, J.P.; MORAES, J.C.F.; HENKES, L.E.; GONÇALVES, P.B.; WEIMER, T. **Avanços na reprodução bovina.** Pelotas. Ed. Universitária, UFPel, 2000, p.77.

GARCIA, M.R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; NIZIELSKI, S.E.; WILLIAMS, G.L. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 8, p. 2158-2167, 2002.

GARCIA-MAYOR, R.V.; ANDRADE, M.A.; RIOS, ; LAGE, M; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body

mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, p. 2849-2855, 1997.

GAVRILOVA, O.; BARR, V.; MARCUS-SAMUELS, B.; REITMAN, M. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor **. Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 48, p. 30546-30551, 1997.

GAZAL O.S.; LESHIN L.S.; STANKO R.L.; THOMAS M.G.; KEISLER D.H.; ANDERSON L.L., WILLIAMS G.L. Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: correspondence with the tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y. **Biology Reproduction.** v. 59, n.3, p.676-83, 1998.

GILL C. J.; RISSMAN E. F. Female sexual behavior is inhibited by short- and long-term food restriction, **Physiology & behavior**, v. 61, n3, p. 387-394, 1997.

GINTHER O, J.; BERGFELT D.R.; BEG M.A.; KOT K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology Reproduction** , v. 64, n.1, p.197-205, 2001.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L.J. ; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle **Theriogenology**, v. 48, n. 1, p. 75-87, 1997.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle**, Theriogenology** , v. 50, n. 4, p. 507-519, 1998.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations **Theriogenology**, v.*52, n. 6*, 1999, p. 1079-1093, 1999.

GLASS, A. R., W. T. DAHMS, R. S. SWERDLOFF. 1979. Body fat and puberty in rats: alteration by changes in diet. **Pediatric Research**. v.13, n.7, 1979.

GOLDEN, P L.; MACCAGNAN, T J.; PARDRIDGE, W, M. Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. **Journal of Clinical Investigation,** v. 99, n.1, p. 14–18, 1997.

GOULART, R. S. **Desempenho, características de carcaça, composição corporal e exigências líquidas de crescimento de bovinos Nelore e três cruzamentos *Bos taurus* x Nelore.** Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, 2006. 76 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal.** 7. ed. São Paulo: Editora Manole, 2004. p. 513.

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, n. 5223, p. 543–546, 1995.

HALL, J.B.; STAIGMILLER, R.B.; BELLOWS, R.A.; SHORT, R.E.; MOSELEY, W.M.; BELLOWS, S.E. Body composition and metabolic profiles associated with puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 11, p. 3409-3420, 1995.

HANKINS, O.G.; HOWE, P.E. **Estimation of the composition of beef carcasses and cuts.** Washington, USDA, 1946. (Tech Bulletin 926).

HANSEL, W.; CONVEY, E.M. Physiology of the Estrous Cycle **Journal Animal Science.**. v. 57, p. 404-424, 1983.

HANSEN P.J.; KAMWANJA L.A.; HAUSER E.R. Photoperiod influences age at puberty of heifers, **Journal Animal Science.** V.57, n.4, p.985-92.1983.

HENRIQUE, W.; SAMPAIO, A. A. M.; LEME, P. R. Estimativa da composição química corporal de tourinhos Santa Gertrudis a partir da composição química e física das 9ª-10ª-11ª costelas. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v. 32, n. 3, p. 709-718, 2003.

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

HENRY, B.A.; GODING, J.W.; ALEXANDER, W.S.; TILBROOK, A.J.; CANNY, B.J.; DUNSHEA, F.; RAO, A.; MANSELL, A.; CLARKE, I.J. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1175-1182, 1999.

HERMAN-GIDDENS, M.E.; SLORA, E.J.; WASSERMAN, R.C.; BOURDONY, C.J.; BHAPKAR, M.V.; KOCH, G.G.; HASEMEIER, C.M. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. **Pediatrics,** v. 99, n. 4, p. 505-512, 1997.

HILL, R.A.; MARGETIC, S.; PEGG, G.G.; GAZZOLA, C. Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. **Int J Obes Relat Metab Disord,** v. 22, p. 765-777, 1998.

HONARAMOOZ, 1999; - 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.

HOPPER, H.W.; WILLIAMS, S.E.; BYERLEY, D.J.; ROLLOSSON, M.M.; AHMED, P.O.; KISER, T.E. Effect of prepubertal body weight gain and breed on carcass composition at puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 5, p. 1104-1111, 1993.

HOSSNER, K.L. Celular, molecular and physiological aspects of leptin: potential application in animal production. **Canadian Journal of Animal Science,** v. 78, p. 463-472, 1998.

HOUSEKNECHT K.L.; MANTZOROS C.S.; KULIAWAT R.; HADRO E.; FLIER J.S, KAHN B.B. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity**. Diabetes.** V.45, n.11, p.1638-43, 1996.

HOUSEKNECHT K.L.; PORTOCARRERO C.P. Leptin and its receptors: Regulators of whole-body energy homeostasis, **Domestic Animal Endocrinology**, v.15 , n.6 p. 457-475,1998.

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

HSU S.Y.; LAI R.J. FINEGOLD M. HSUEH A. J. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis**. Endocrinology.** v.137, n.11, p. 4837-43,1996.

HSU S.Y.; HSUEH A.J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. **. Physiology Reviews.** v. 80, n.2, p.593-614, 2000.

I'ANSON, H.; R. I. WOOD, D. C.; BUCHOLTZ, M. ; PADMANABHAN, D V. Hypothalamic vs pituitary stimulation of LH release in the prepubertal female lamb. **Biology Reproduction**. p.42-47, 1990.

IMAKAWA K.; DAY M.L.; GARCIA-WINDER M.; ZALESKY D.D.; KITTOK R.J.; SCHANBACHER B.D. KINDER J. E. Endocrine changes during restoration of estrous cycles following induction of anestrus by restricted nutrient intake in beef heifers. **Journal Animal Science,** v.63, n.2, p.565-71, 1986a.

IMAKAWA, I.C.; KITTOK, R. J.; KINDER J. E. Luteinizing hormone secretion after withdrawal of exogenous progestogen in heifers fed three levels of dietary energy. **Journal Animal Science**. v.58, p.151, 1984.

IMAKAWA, K.; DAY, M. L.; .ZALESKY, D. D.; GARCIAWINDER, M.; KITTOK, **R.** J. KINDER, J. E. Influence of dietary-induced weight changes on serum luteinizing hormone, estrogen and progesterone in the bovine female. **Biology Reproduction. V.**35, p.377, 1986b.

IMAKAWA, K.;. KITTOK, **R.** J.; KINDER, E. The influence of dietary energy intake on progesterone concentrations in beef heifers. **Journal Animal Science.** 56:454, 1983.

IQBAL, J.; POMPOLO, S.; CONSIDINE, R.V.; CLARKE, I.J. Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes, and gonadotropes in the ovine anterior pituitary. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1515-1520, 2000.

IRELAND J.J.; ROCHE J.F. Growth and differentiation of large antral follicles after pontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles, **Journal Animal Science**, v.57, n.1, p.157-67, 1983b.

IRELAND JJ, ROCHE J. F, Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. **Endocrinology**. v. 112, n.1, p. 150-6. 1983a.

JIN L.; ZHANG S.; BURGUERA B.G.; COUCE M.E.; OSAMURA R.Y.; KULIG E.; LLOYD R.V. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells Endocrinology. v.141, n.1, p.333-9, 2000.

KALRA S.P. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge . **Endocrinology Revision.** V.14, n.5, p.507-38, 1993.

KALRA S.P.; CROWLEY W.R; NEUROPEPTIDE Y. A. Novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to luteinizing hormone. **Frontiers in Neuroendocrinology,** v.13, n.1 p.1-46, 1992.

KALRA S.P.; KALRA P.S. Nutritional infertility: The role of the interconnected hypothalamic neuropeptide Y-galanin-opioid network, **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.17, n.4, p. 371-401, 1996.

KALRA S.P; DUBE M.G.; PU S.; XU B.; HORVATH T.L; KALRA P.S Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight . . **Endocrinology Review,** 20, n.1, p.68-100, 1999.

KARLSSON C.; LINDELL K.; SVENSSON E.; BERGH C.; LIND P.; BILLIG H.;CARLSSON L.M.; CARLSSON B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary **Journal Clinical Endocrinol Metabolism.** v.82, n.12 , p.4144-8, 1997.

KASTIN, A.J.; AKERSTROM, V. Fasting, but not adrenalectomy, reduces transport of leptin into the brain. **Peptides**, v. 21, p. 679–682, 2000.

KAYNARD, A. H.; PAU, K. Y.; HESS, D. L.; SPIES, H. G. Third-ventricular infusion of neuropeptide Y suppresses luteinizing hormone secretion in ovariectomized rhesus macaques**.** **Endocrinology**; v.127, n.5, p. 2437–2444, 1990.

KENNEDY, G. C. The Role of Depot Fat in the Hypothalamic Control of Food Intake in the Rat. **Proceedings of the Royal Society of London**. *Series B, Biological Sciences*, v. 140, n. 901,p. 578-592, 1953.

KENNEDY, G. C.; MITRA**,** J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. **Journal Physiology**. *v.*166 n.2, p.408–418.1**,** 1963.

KIESS, W. A.; REICH, K.; MEYER, K.; GLASOW, A.; DEUTSCHER, J.; KLAMMT, J.; YANG, Y.; G. MÜLLER , G. Role for Leptin in Sexual Maturation and Puberty?, J. Kratzsch **Hormones Research,** v.51, p.55-63. 1999.

KIKUCHI, N.; ANDOH, K.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI. Y. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 66-71, 2001.

KILE J.P.; ALEXANDER B.M.; MOSS G.E.; HALLFORD D.M.; NETT T.M. Gonadotropin-releasing hormone overrides the negative effect of reduced dietary energy on gonadotropin synthesis and secretion in ewes**. Endocrinology**.v.128, n.2, p. 843-9, 1991.

KIM, J. B.; SARRAF, P.; WRIGHT, M.; YAO, K M.; MUELLER, E.; SOLANES, G.; LOWELL, B B.; SPIEGELMAN, B. M. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. **Journal Clinical Invest.** v.101, n.1, p. 1–9, 1998.

KINDER, J. E .; DAY, M. L.; KITTOK, R. J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes**. Journal Reproduction Fertility Suppl.** v.34, p.167-86, 1987.

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 Suppl., p. 393-407, 1995.

KITAWAKI, J.; KUSUKI, I.; KOSHIBA, H.; TSUKAMOTO, K.; HONJO H. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 8, p. 708-713, 1999.

KORSMEYER, S. J.; SHUTTER J.R.; VEIS D.J.; MERRY D.E, OLTVAI Z.N. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death**. Semin Cancer Biology.** v.4, n.6, p.327-32, 1993.

KULICK, L.J. ; KOT, K,. WILTBANK, M.C,; GINTHER, O.J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers **Theriogenology,** *v. 52, n. 5*, p. 913-921, 1999.

LANNA, D. P. D. **Estimativa da composição química do corpo vazio de tourinhos Nelore através da gravidade específica da carcaça e da composição de cortes das costelas.** 1988.

131 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

LEBRETHON, M.C.; VANDERSMISSEN, E.; GÉRARD, A.; PARENT, A.S.; JUNIEN, J.L.; BOURGUIGNON, J.P. In vitro stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms **Endocrinology,** v. 141, n. 4, p. 1464-1469, 2000.

LEME, P.R. **Estimativa da composição química corporal de novilhos Nelore através do espaço de Deutério**. Universidade Estadual Paulista, 1993. 78p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1993.

LEME, P.R.; BOIN, C.; ALLEONI, G.F. et al. Estimativa da composição química corporal de novilhos Nelore através do espaço de deutério. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.23, n.3, p.441-452, 1994

LEME, P.R.; LANNA, D.P.D.; HENRIQUE, W.; ALLEONI, G.F.; BOIN, C. Substituição do Grão de Milho por Polpa de Citros em Dietas com Diferentes Níveis de Concentrado. 2. Taxas de Deposição e Composição Química Corporal **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.29, n.3, 2000.

LEON, S.; CONNIE, C.; CRISTINA,F. Ovarian action of leptin: Effects on insulin-like growth factor-I-stimulated function of granulosa and thecal cells , **Endocrine**, v.12, n.1, p. 53-59, 2000.

LEVINE, J. E.,PAU, K-Y.F; RAMIREZ, V. D.; JACKSON, G. L. Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in **un**anesthetized, ovariectomized sheep. **Endocrinology v.**11 , p.1448, 1982.

LIN J, ; RICHARD BARB C.; KRAELING R.R.; RAMPACEK G.B. Developmental changes in the long form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. **Biology of Reproduction,** v. 64, n. 6 ,p.1614-8, 2001.

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, n. 1, p. 53-61, 2000.

LUCY M.C,; STAPLES C.R.; MICHEL F.M.; THATCHER W.W. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows**, Journal of Dairy Science.** v.74, n. 2473-82, 1991.

M. J. ESTIENNE, K. K. SCHILLO, S. M. HILEMAN, M. A. GREEN, S. H. HAYES, and J. A. BOLING Effects of Free Fatty Acids on Luteinizing Hormone and Growth Hormone Secretion in Ovariectomized Lambs. **Endocrinology**, v.126, p.1934 – 1940, 1990.

MAAMRA, M.; BIDLINGMAIER, M.; POSTEL-VINAY, M.C.; WU, Z.; STRASBURGER, C.J.; ROSS, R.J.M. Generation of human soluble leptin receptor by proteolytic cleavage of membrane-anchored receptors. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4389-4393, 2001.

MÁČAJOVÁ, M.; LAMOŠOVÁ, D.; ZEMAN, M. Role of leptin in farm animals: a review. **Journal of Veterinary Medicine,** v. 51, n. 4, p. 157–166, 2004.

MACIEL, M.N.; ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; KEISLER, D.H.; NEVES, J.P.; WILLIAMS G.L. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: Effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 10, p. 2930-2936, 2004a.

MACIEL, M.N.; ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; KEISLER, D.H.; NEVES, J.P.; WILLIAMS G.L. Leptin prevents fasting-mediated reductions in pulsatile secretion of luteinizing hormone and enhances its gonadotropin-releasing hormone-mediated release in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 1, p. 229-235, 2004b.

MACKEY D. R.; SREENAN J.M.; ROCHE J.F.; DISKIN M.G. 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.1601-7, 1999.

MACKINNON, M.J.; TAYLOR, J.F.; HETZEL, D.J.S. Genetics variation and covariation in beef cow and bull fertility. **Journal of Animal Science,** v. 68, p. 1208-1214, 1990.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R.E.; LEE, G.H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature Medicine,** v. 1, n. 11, p. 1155–1161, 1995.

MANTZOROS, C.S.; FLIER, J.S.; ROGOL, A.D. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** v. 82, n. 4, p. 1066–1070, 1997.

MASUHARA M.; SAKAMOTO H.; MATSUMOTO A.; SUZUKI R.; YASUKAWA H.; MITSUI K.; WAKIOKA T.;YOSHIMURA A. Cloning and characterization of novel CIS family genes **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.239 , n.2, p. 439-446, 1997.

MATKOVIC, V.; ILICH, J.Z.; SKUGOR, M.; BADENHOP, N.E.; GOEL, P.; CLAIRMONT, A.; KLISOVIC, D.; NAHHAS, R.W.;LANDOLL, J.D. Leptin Is Inversely Related to Age at Menarche in Human Females. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** v. 82, p. 3239-3245, 1997.

MATSUDA J.;YOKOTA I.; TSURUO Y.; MURAKAMI T.; ISHIMURA K.; SHIMA K.; KURODA Y. Development changes in long-form leptin receptor expression and localization in rat brain. . **Endocrinology**. v.140, n.11, p.5233-8, 1999.

MATTERI , R. L. Overview of central targets for appetite regulation. **Journal of Animal Science**, v.79, E148–E158, 2001.

McCANN, S. M. Regulation of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. In: D. B. Dill, E. F. Adolph, and C. G. Wilbur (Ed.) Handbook of Physiology, Section **7:** Endocrinology, Volume IV**;** The Pituitary Gland, Part **2. American Physiological Society, Washington,** DC, 1974.

MCCANN, S. M.; KIMURA, M.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; RETTORI, S.; YU, W. H. Hypothalamic Control of FSH and LH by FSH-RF, LHRH, Cytokines, Leptin and Nitric Oxide. **NeuroImmunoModulation,** v. 5, p.193-202, 1998.

MCSHANE, T. M.; D. H. KEISLER**.** Effect of dietary energy on secretion on luteinizing hormone (LHI and response to hourly injections of LH in ewe lambs during increasing daylength. **Biology Reproduction.** v. 42, n**.** 47, 1990.

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.

MENDES, C.Q. **Silagem de cana-de-açúcar na alimentação de ovinos e caprinos: valor nutritivo, desempenho e comportamento ingestivo.** Piracicaba, SP, 2006, 104f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2006.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MEYER K.; HAMMOND K.; PARNELL P.F.; MACKINNON M.J.; IVARAJASINGAM S. Estimates of heritability and repeatability for reproductive traits in Australian beef cattle. **Livestock Production Science**,v. 25 n.2, p. 15-30, 1990.

MINER, J.L. Recent advances in the central control of intake in ruminants**, Journal Animal Science**. V.70, n.4, p.1283-9, 1992.

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

MORIN, L.P. Environment and hamster reproduction: responses to phase-specific starvation during estrous cycle,**American Journal Physiology**, v.251, 663-9, 1986.

MORRISON C.D.; DANIEL J.A.; HOLMBERG B.J.;DJIANE J.; RAVER N.; GERTLER A.; KEISLER D.H. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone **Journal Endocrinology,** v.168, n.2, p.317-24, 2001.

MORRISON, C.D.; DANIEL, J.A.; HAMPTON, J.H; BUFF, P.R.; MCSHANE, T.M.; THOMAS, M.G.; KEISLER, D.H. Luteinizing hormone and growth hormone secretion in ewes infused intracerebroventricularly with neuropeptide Y. **Domestic Animal Endocrinology,** v. 24, n. 1, p. 69-80, 2003.

MORRISON, C.D.; WOOD, R.; MCFADIN, E.L.; WHITLEY, N.C.; KEISLER, D.H. Effect of intravenous infusion of recombinant ovine leptin on feed intake and serum concentrations of GH, LH, insulin, IGF-1, cortisol, and thyroxine in growing prepubertal ewe lambs. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, n. 2, p. 103-112, 2002.

MOUNZIH, K.; LU, R.; CHEHAB, F.F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese *ob/ob* males. **Endocrinology,** v. 138, n. 3, p. 1190-1193, 1997.

MÜNZBERG H.; MYERS M.G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance .**National Neuroscience.** V.8, n.5, p.566-70, 2005.

MURPHY M.G.; ENRIGHT W.J.; CROWE M.A.; MCCONNELL K.; SPICER L.J.; BOLAND M.P.; ROCHE J.F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. **Journal of Reproduction Fertility.** 1991 v. 92, n.2, p.333-8, 1991.

NAGATANI, S.; ZENG, Y.; KEISLER, D.H.; FOSTER, D.L.; JAFFE C.A. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 3965-3975, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrients requirements of beef cattle.** 7 ed. Washington, D.C., 242 p., 1996.

NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science,** v. 71, P. 2051-2069, 1988.

NOGUEIRA, G.P. **Puberdade em novilhas Nelore.** 2003. 89 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2003.

NOGUEIRA, G.P. Puberty in south american Bos indicus (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science,** v. 82-83, p. 361-372, 2004.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washinton, D.C.: National Academic Press, 2001. 381 p.

OLIVEIRA, C.M.G.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; GAMBARINI, L.M.; KUNZ, T.L.; VIU, M.A. Índice de gestação em novilhas Nelore que atingiram a puberdade em idade precoce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 237-239, 2003.

OYEDIPE, E. O.; OSORI, D. I. K.; AKEREJOLA, O.; et al. Effect of level of nutrition on onset of puberty and conception rates of zebu heifers. **Theriogenology**, v. 18, n. 5, p. 525-539, 1982.

OYEDIPE, E.O.; VOH, A.A.; MARIRE, B.N. Plasma progesterone concentrations during the oestrus cycle and following fertile and non-fertile inseminations of zebu heifers. **Brazilian Veterinary Journal**, v.142, p.41-6, 1986.

PATTERSON, D.J.; PERRY, R.C.; KIRACOFE, G.H.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; CORAH, L.R. Management considerations in heifer development and puberty **Journal of Animal Science.** v.70, n.12, p. 4018-35, 1992.

PAULINO, P. V. R. **Desempenho, composição corporal e exigências nutricionais de bovinos Nelore de diferentes classes sexuais.** 2006. 159 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

PAULINO, P. V. R.; COSTA, M. A. L.; VALADARES FILHO, S. C. Validação das equações desenvolvidas por Hankins e Howe para predição da composição de carcaça de zebuínos e desenvolvimento de equações para estimativa da composição corporal. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v. 34, n. 1, p. 327-339, 2005.

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. 28, p.540-3, 1995.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Análise genetica de características reprodutivas na raça Nelore.**Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasilia, v. 37, n. 5., p. 703-708, 2002.

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

PEREZ, G.I.; ROBLES, R.; KNUDSON, C.M.; FLAWS, J.A.; KORSMEYER, S.J.; TILLY, J.L. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. **Nature Genetics**, v. 21, p. 200–203, 1999.

POMPOLO, J. I. S.; MURAKAMI, T.; GROUZMANN, E.; SAKURAI, T; MEISTER BJORN, CLARKE, I. J. Immunohistochemical characterization of localization of long-form

leptin receptor (OB-Rb) in neurochemically defined cells in the ovine hypothalamus. **Brain Research**, v. 920, n. 1, 30, p. 55-64, 2001.

PUTRINO, S.M. **Composição de corporal, exigências de energia e proteína para ganho e composição da carne de novilhos Nelore alimentados com dietas com milho grão seco ou úmido contendo gordura não degradável no rúmen**. 2006. 115 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

QIAN, H,; BARB, C.R.; COMPTON, M.M .; HAUSMAN, G.J.; AZAIN, M.J.; KRAELING, R.R.; BAILE, C.A. Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight, and estradiol in pigs. **Domestic Animal Endocrinology, v.**16, n. 2, p. 135-143, 1999.

QUINTON, N.D.; SMITH, R. .; CLAYTON, P. .; GILL, M. .; SHALET, S.; JUSTICE, S.K.; SIMON, S.A.; WALTERS, S.; POSTEL-VINAY, M.C.; BLAKEMORE, A.I.F. Leptin binding activity changes with age: the link between leptin and puberty. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 7, p. 2336-2341, 1999.

RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P.M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 259-270, 2003.

RESTLE, J.;. POLLI, V.A ; DE SENNA, D.B. Efeito de grupo genético e heterosesobre a idade e peso à puberdade e sobre o desempenho reprodutivo de novilhas de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.4, p.701-707, 1999.

RHODES F. M.; ENTWISTLE K.W.; KINDER J.E. Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anestrus in Bos indicus heifers. **Biology Reproduction, v**. 55, n.6, p.1437-43, 1996.

RHODES F.M.; FITZPATRICK L.A.; ENTWISTLE K.W.; DE'ATH G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in Bos indicus heifers before and after nutritional anoestrus, . **Journal Reproduction Fertility.** v.104, n. 1, p.41-9, 1995.

RICHARDS, M.W.; WETTEMANN R.P.; SCHOENEMANN H.M. Nutritional anestrus in beef cows: body weight change, body condition, luteinizing hormone in serum and ovarian activity, **Journal Animal Science,** v.67, n.6, p. 1520-6, 1989.

RIVIER C.; RIVEST S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms, **Biology Reproduction** v. 45, n.4, p. 523-32.1991.

RODRIGUES et al., 2002 - 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, n. 3, p. 603-609, 2002.

RÖJDMARK, SVEN. Influence of Short-Term Fasting on the Pituitary-Testicular Axis in Normal Men . **Hormone Research ,** v.25, p.140-146, 1987.

RONNEKLEIV, 0. K.; S. R. OJEDA,S. M. MCCANN. Undernutrition, puberty and the development of estrogen positive feedback in the female rat. **Biology of Reproduction,** v.19, p.414, 1978.

RUIZ-CORTES, Z.T.; MARTEL-KENNES, Y.; GEVRY, N.Y.; DOWNEY, B.R.; PALIN, M.F.; MURPHY, B.D**.** Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 789-796, 2003.

RUTTER, L. M.; SNOPEK R, MANNS J.G. Serum concentrations of IGF-I in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science.** v.67, n.8, p.2060-6, 1989.

RYAN N. K.; VAN DER HOEK K.H.; RITTER L.J.; ARMSTRONG D.T.; MAGOFFIN D.A.; NORMAN, R.J. Effects of leptin administration and feed restriction on thecal leucocytes in the preovulatory rat ovary and the effects of leptin on meiotic maturation, granulosa cell proliferation, steroid hormone and PGE2 release in cultured rat ovarian follicles, **Reproduction. v.**123, n.6, p.891-8, 2002.

RYAN, N. K.; WOODHOUSE, C. M.; VAN DER HOEK, K. H.; GILCHRIST, R. B.; ARMSTRONG, D. T.; NORMAN, R. J. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. Biology of Reproduction, v. 66, n. 5, p. 1548 – 1554, 2002.

SANTOS, J.E.P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS,** v. 26, n. 1, p. 1077-1088, 1998.

SAS, Institute. SAS/STAT User's guide. Version 8, 6th ed, SAS Institute Inc., Cary, NC, 2000.

SAVASTANO, S. **Efeito do nível do concentrado sobre parâmetros digestivos do feno de capim-gordura (Melinis minutifl ora Pal de Blauv), em bovinos**. 1993. 142 f. Mestrado em Veterinária – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, BeloHorizonte, 1993.

SCHILLO, K.K.; HALL, J.B.; HILEMAN, S.M. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 3994-4005, 1992.

SCHIÖTH, H.B.; WATANOBE, H. Melanocortins and reproduction. **Brain Research Reviews**. v.38, n. 3 p. 340-50, 2002

SCHMIDT, P. **Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar.** 2006.

229p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SHIMABUKURO, M., WANG, M.Y., ZHOU, Y.T., NEWGARD, C.B., UNGER, R.H. Protection against lipoapoptosis of β cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. **Proceedings of Natural Academy of Sciences**, v. 95, p. 9558–9561, 1998.

SILVA, A. E. D. F.; ROMANO, M. A. Alguns aspectos da maturidade de fêmeas da raça Canchim, Nelore e meio sangue Canchim e Nelore, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Eds.) In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, IX. **Anais...** Brasil, Belo Horizonte, MG, 1991.

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

SILVA, S.L.; LEME, P.R.; FIGUEIREDO, L.G.G. Correlações entre características de carcaça obtidas in vivo por ultra-sonografia e na carcaça post mortem em novilhos Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38. 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001.

SINHA, M.K.; OHANNESIAN, J.P.; HEIMAN, M.L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T.W.; MAGOSIN, S.; MARCO, C.; CARO, J.F. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. **Journal of Clinical Investigation,** v. 97, n. 5, p. 1344–1347, 1996.

SIROIS J, FORTUNE J.E. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology.** ,v.127, n.2, p.916-25.1990.

SMITH, A.M.; REID, J.T. Use of chromic oxide as an indicator of fecal output for the purpose of determining the intake of a pasture herbage by grazing cows. **Journal of Dairy Science**, v. 38, n. 5, p. 515-524, 1955.

SOUZA, E.M.; MILAGRES, J.C.; SILVA, M.A.; REGAZZI, A.J.; CASTRO, A.G.C. Influências genéticas do meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia,** v. 24, n. 6, p. 926-935, 1995.

SPICER , L. J, FRANCISCO C.C. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function, **Endocrinology.** v. 138, n. 8, p.3374-9, 1997.

SPICER, L. J,; FRANCISCO C.C. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis, **Biology Reproduction** v. 58, n.1, p. 207-12, 1998.

SPICER, L.J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domestic Animal Endocrinology,** v. 21, n. 4, p. 251-270, 2001.

SPICER, L.J.; FRANCISCO, C.C. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. **Endocrinology**, v. 138, p. 3374-3379, 1997.

STAGG K,; SPICER L.J.; SREENAN J.M.; ROCHE J.F.; DISKIN M.G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum**. Biology Reproduction**, v.59, v.4, p.777-83, 1998.

STARR R, WILLSON T.A.; VINEY E.M.; MURRAY L.J.; STOCK, A.E.; FORTUNE J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters, **Endocrinology.** v.132, n.3, p.1108-14, 1993.

THIVEND, P.; TOULLEC, R.; GUILLOTEAU, P. Digestive adaptation in the preruminant. In: Ruckebusch Y, Thivend P, editors. Digestive physiology and metabolism in ruminants. Lancaster: MTP Press, 1980, p. 513–37.

THOMAS, G.B.; MERCER, J.E; KARALIS, T.; RAO, A.; CUMMINS J.T.; CLARKE I.J. Effect of restricted feeding on the concentrations of growth hormone (GH), gonadotropins, and prolactin (PRL) in plasma, and on the amounts of messenger ribonucleic acid for GH, gonadotropin subunits, and PRL in the pituitary glands of adult ovariectomized ewes. **Endocrinology,** v.126, n.3, p.1361-7, 1990.

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.

VAN DER SPUY Z.M.**Nutrition and reproduction. Clinical Obstet Gynaecol.** v.12, n.3, p.579-604, 1985.

VERGONI, H.B.; SCHIÖTH, A. Bertolini Melanocortins and feeding behavior. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 54, n. 3, p. 129-134, 2000.

WILLIAMS G.; HARROLD J. A. H.; CUTLER, D.J. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. **Proceedings of the Nutrition Society,** 59 , p 385-396 n.08, 2000.

WILTBANK J. N. Effects of Heterosis on Age and Weight at Puberty in Beef Heifers **Journal of Animal Science**. V.25, p.744-751, 1966.

WILTBANK, J. N.; KASSON, C. W.; INGALLS, J. E. Puberty in crossbred and straightbred beef heifers on two levels of feed **Journal of Animal Science**.., v. 29, p. 602-605, 1969.

WOLFE, M.W.; STUMPF, T.T.; WOLFE, P.L.; DAY, M.L.; KOCH, R.M.; KINDER, J.E. Effect of selection for growth traits on age and weight at puberty in bovine females. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 6, p. 1595-602, 1990.

YELICH J.V.; WETTEMANN R.P,; DOLEZAL H.G,;LUSBY K.S.; BISHOP D.K, SPICER .J. Effects of growth rate on carcass composition and lipid partitioning at puberty and growth hormone, insulin-like growth factor I, insulin, and metabolites before puberty in beef heifers **Journal of Animal Science.**v.73, n.8, p. 2390-405, 1995.

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

YU, W. H.; KIMURA, M.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; MCCANN, S. M. Role of leptin in hypothalamic–pituitary function. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** USA, v. 94, n. 3, p. 1023–1028, 1997.

ZACHOW, R.J.; WEITSMAN, S.R.; MAGOFFIN, D.A. Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-{beta} of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 4, p. 1104-1109, 1999.

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

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.425-32, 1994.

ZIEBA D.A.; AMSTALDEN M; MORTON S, GALLINO J.L.; EDWARDS J.F.; HARMS P.G.; WILLIAMS G.L. Effects of leptin on basal and GHRH-stimulated GH secretion from the bovine adenohypophysis are dependent upon nutritional status **Journal Endocrinology.** 178, n.1 p. 83-9., 2003.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; MORTON, S.; MACIEL M.N.;, KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin at the hypothalamic-hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 3, p. 804–812, 2004.

ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. **Domestic Animal Endocrinology,** v. 29, n. 1, p. 166-185, 2005.