

ALINE VAICIUNAS

**EXPRESSÃO DE GENES HIPOTALÂMICOS EM NOVILHAS  
NELORE PRECOSES E NÃO PRECOSES**

Pirassununga

2007

ALINE VAICIUNAS

**EXPRESSÃO DE GENES HIPOTALÂMICOS EM NOVILHAS  
NELORE PRECOSES E NÃO PRECOSES**

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

**Departamento:**

Nutrição e Produção Animal

**Área de concentração:**

Nutrição e Produção Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva

Pirassununga

2007

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

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1846  
FMVZ

Vaiciunas, Aline  
Expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore precoces e não-precoces. / Aline Vaiciunas. – Pirassununga : A. Vaiciunas, 2007.  
64 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.  
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

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

1. Bovinos. 2. Leptina. 3. NPY. 4. SOCS-3. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

*PARECER*

Interessado: Aline Vaiciunas

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto protocolado sob o número 972/2006, intitulado: “Expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore precoces e não precoces”, no qual foram utilizados 12 (doze) bois (amostras do hipotálamo), sob responsabilidade do Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

**São Paulo, 01 de março de 2007**

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

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VAICIUNAS, Aline

Título: Expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore precoces e não precoces

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar,  
ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."

(Martin Luther King)

"Dedico este projeto ao meu amor Daniel Filho pelo carinho, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida e a todas as pessoas que, imbuídas na busca do desenvolvimento profissional e pessoal, espalham por toda a terra os dons que receberam de Deus".

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela luz e força concedida, ajudando-me a realizar este trabalho com grande prazer e a alcançar bons resultados;

Ao meu orientador Dr. Luis Felipe Prada e Silva pela ajuda, paciência, orientação e amizade neste projeto;

Aos meus pais que sempre me apoiaram em todas as decisões importantes da minha vida e me confortaram nos momentos mais difíceis;

Ao meu amor Daniel Ramos Vieira Filho, por ter dado um novo sentido na minha vida. Obrigada pelo apoio, pela paciência e por não ter me deixado desistir num momento de desespero;

À Universidade de São Paulo e ao Curso de Mestrado em Nutrição e Produção Animal, agradeço a oportunidade de ter realizado mais esta etapa em minha vida;

A todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, cuja grande amizade e extraordinários conhecimentos técnicos continuam a nos inspirar em todos os nossos esforços;

À funcionária da secretaria de pós-graduação Cristiane pelas orientações e dedicação aos pós-graduandos;

A todos os colegas dos Laboratórios de Morfofisiologia Molecular e Biotecnologia Animal em especial a Giovana Merighe, Birita, Lílian Zaros e Ana Paula Dini Adreoti pela incansável ajuda em todos os ensaios de PCR;

Aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões;

A todos meus colegas de pós-graduação da FMVZ, pela amizade e convivência harmônica e feliz,



A todos os funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZUSP;

A meus amigos e a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

VAICIUNAS, A. **Expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore precoces e não precoces.** [Hypothalamic genes expression in early- and late-maturing *bos indicus* heifers]. 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

O mecanismo pelo qual a sinalização da leptina no hipotálamo permite o início da puberdade ainda não foi esclarecido. Um possível mecanismo para a ação molecular da leptina no eixo reprodutivo é constituído por uma alteração na sinalização do NPY. Objetivou-se neste estudo foi verificar se novilhas precoces *Bos taurus indicus* possuem a expressão modificada de genes hipotalâmicos relacionadas à sinalização da leptina. Dentre uma população de 500 novilhas entre 20 e 25 meses de idade, 100 novilhas foram selecionadas com base nas características da raça (Nelore), mês de nascimento e peso corpóreo (290 kg). Estas 100 novilhas foram classificadas de acordo com a presença ou não de um corpo lúteo (CL) notável. Dez novilhas sem um CL e dez novilhas com CL notável receberam uma injeção de prostaglandina, e de acordo com a observação visual de cio e palpação retal, 6 novilhas precoces e 6 novilhas não precoces foram selecionadas para o experimento. Estas 12 novilhas foram abatidas e amostras de tecido do hipotálamo foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. A expressão de SOCS-3, NPY, NPY-Y1 e NPY-Y4 no hipotálamo foi quantificada por PCR em tempo real usando uma proteína ribossomal RP-L19 como um gene de referência. A expressão hipotalâmica de SOCS-3 ou NPY não foi diferente entre os grupos de novilhas ( $P > 0,50$ ). Acreditava-se que as novilhas ciclando poderiam ser resistentes à leptina devido a um aumento na expressão do SOCS-3 no hipotálamo. Houve uma tendência ( $P = 0,10$ ) de redução na expressão dos receptores do NPY, NPY-Y1 e NPY-Y4 em novilhas que atingiram a puberdade precocemente. A expressão do NPY-Y1 foi 8.3 vezes menor e a expressão do NPY-Y4 foi 14.3 vezes menor em novilhas precoces. Quando analisados em conjunto, houve uma redução de 11 vezes na expressão dos receptores de NPY em novilhas precoces, e este efeito foi estatisticamente significativo ( $P = 0,03$ ). Estes resultados sugerem que, a menor expressão dos receptores de NPY pelo hipotálamo de novilhas precoces pode torná-lo menos

sensível à inibição do NPY, e permitir a obtenção da puberdade com maior peso vivo e níveis menores de leptina circulante. Em conclusão, não houve uma correlação entre a expressão do gene NPY e SOCS-3 e a precocidade sexual das novilhas Nelore, porém houve uma tendência significativa de redução da expressão dos receptores de NPY-Y1 e NPY-Y4 no hipotálamo das novilhas precoces.

Palavras-chave: Bovinos. Leptina. NPY. SOCS-3.

## ABSTRACT

VAICIUNAS, A. **Hypothalamic genes expression in early- and late-maturing *Bos indicus* heifers**. [Expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore precoces e não precoces]. 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

The molecular mechanism by which leptin signaling in the hypothalamus might permit the initiation of puberty has not been elucidated. One possible mechanism for leptin molecular action on the reproductive axis is affecting NPY signaling. It was our objective to test whether early-maturing *Bos indicus* heifers have altered expression of hypothalamic genes related to leptin signaling. Among a population of 500 heifers between 20 and 25 months of age, 100 heifers were selected based on breed attributes (Nelore), month of birth, and body weight (290 kg). These 100 heifers were scored as prepubertal or pubertal according to the presence or not of a noticeable corpus luteum (CL). Ten heifers without a CL and ten heifers with noticeable CL received a prostaglandin injection, and according to visual observation of heat and rectal palpation, 6 prepubertal and 6 pubertal heifers were selected for the experiment. These 12 heifers were slaughtered and samples of hypothalamus were collected and frozen in liquid nitrogen. Expression of SOCS-3, NPY, NPY-Y1 and NPY-Y4 at the hypothalamus was quantified by real-time PCR using the ribosomal protein RP-L19 as a reference gene. Hypothalamic expression of SOCS-3 or NPY was not different between groups of heifers ( $P > 0,50$ ). It was thought that late-maturing heifers could be resistant to leptin due to an increased expression of SOCS-3 at the hypothalamus. However, there was a tendency for NPY-Y1 and NPY-Y4 expression to be reduced in heifers that reached puberty earlier ( $P = 0,10$ ). Expression of NPY-Y1 was 8.3-folds lower and NPY-Y4 expression was 14.3-folds lower in early-maturing heifers. When analyzed together, there was an 11-fold reduction in NPY receptors expression in early-maturing heifers, and this effect was statistically significant ( $P = 0,03$ ). These results suggest that, because of the lower expression of NPY receptors, the hypothalamus of early-maturing heifers could be less sensitive to NPY inhibition, and therefore reach puberty with lower levels of

circulating leptin. In conclusion, there was no effect between the expression of NPY and SOCS-3 and sexual precocity of Nelore heifers, but there was a significant tendency of reduction in NPY-Y1 e NPY-Y4 receptors expression in the hypothalamus of sexually precocious heifers.

Key words: Bovines. Leptin. NPY. SOCS-3.

## LISTA DE FIGURAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1 - | Gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA total, podendo-se visualizar as bandas estruturais de RNA ribossômico (28S e 18S) ..... | 42 |
| Figura 2 - | Gel de agarose 1% para verificação de amplificação dos genes de interesse .....  | 43 |
| Figura 3 - | Curva de dissociação das 11 novilhas para o gene RP-L19 .....  | 44 |
| Figura 4 - | Curva de dissociação das 11 novilhas para o gene SOCS-3 .....  | 45 |
| Figura 5 - | Curva de dissociação das 11 novilhas para o gene NPY .....   | 45 |
| Figura 6 - | Curva de dissociação das 11 novilhas para o gene NPY-Y1 .....  | 46 |
| Figura 7 - | Curva de dissociação das 11 novilhas para o gene NPY-Y4 .....  | 46 |
| Figura 8 - | Curvas de diluição geradas do PCR em tempo real para RP-L19, SOCS-3, NPY, NPY-Y1 e NPY-Y4 .....  | 48 |
| Figura 9 - | Razão da expressão gênica para os genes SOCS-3, NPY, NPY-Y1 e NPY-Y4 entre as novilhas precoces e não precoces .....                             | 51 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Seqüência, acesso genbank e tamanho dos fragmentos amplificados em cada par de <i>primer</i> desenhado ..... | 37 |
| Tabela 2 - Programa utilizado na amplificação dos genes RP-L19, SOCS-3 e NPY .....                                      | 38 |
| Tabela 3 - Temperatura de dissociação .....   | 47 |
| Tabela 4 - Cálculo da eficiência da amplificação dos genes .....  | 49 |
| Tabela 5 - Quantificação da expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore .....                                   | 50 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |  |
|--------|--|
| CIS    | Seqüência induzível de citocina                        |
| FSH    | Hormônio folículo estimulante                          |
| GH     | Hormônio do crescimento                                |
| GnRH   | Hormônio liberador de gonadotrofina                    |
| IGF-I  | Fator de crescimento semelhante à insulina I           |
| JAK    | Janus quinase  |
| LH     | Hormônio luteinizante                                  |
| NPY    | Neuropeptídeo Y  |
| NPY-Y1 | Neuropeptídeo Y1                                       |
| NPY-Y4 | Neuropeptídeo Y4                                       |
| RNAm   | Ácido ribonucléico mensageiro                          |
| RP-L19 | Proteína ribossomal L-19                               |
| RT-PCR | Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa |
| SOCS-3 | Supressor de sinalização de citocina 3                 |
| STAT   | Transdutor de sinal e ativador de transcrição          |
| TYK2   | Tirosina quinase 2                                     |



## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                       | 18 |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                            | 21 |
| 2.1      | Raça Nelore .....   | 21 |
| 2.2      | Puberdade .....   | 22 |
| 2.3      | Leptina .....   | 24 |
| 2.4      | Mecanismos moleculares de ação da leptina no hipotálamo ..... | 26 |
| 2.5      | SOCS-3 .....  | 27 |
| 2.6      | NPY .....   | 28 |
| 2.7      | NPY-Y1 .....  | 29 |
| 2.8      | NPY-Y4 .....  | 30 |
| <b>3</b> | <b>HIPÓTESE</b> .....   | 32 |
| <b>4</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 33 |
| 4.1      | Objetivo Geral.....   | 33 |
| 4.2      | Objetivos Específicos .....                                   | 33 |
| <b>5</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                               | 34 |
| 5.1      | Animais .....   | 34 |
| 5.2      | Localização do hipotálamo .....                               | 35 |
| 5.3      | Análise de expressão gênica .....                             | 35 |
| 5.3.1    | <b>Local do experimento</b> .....                             | 35 |
| 5.3.2    | <b>Extração de RNA total</b> .....                            | 35 |
| 5.3.3    | <b>Síntese de cDNA</b> .....                                  | 36 |
| 5.3.4    | <b>Desenho dos <i>primers</i></b> .....                       | 37 |
| 5.3.5    | <b>Amplificação de cDNA por PCR</b> .....                     | 37 |
| 5.4      | Quantificação relativa da expressão gênica .....              | 38 |
| 5.4.1    | <b>Local do experimento</b> .....                             | 38 |
| 5.4.2    | <b>Reações de PCR em tempo real</b> .....                     | 39 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 5.4.3    | <b>Eficiência de amplificação</b> .....                      | 40        |
| 5.4.4    | <b>Escolha do gene controle</b> .....                        | 40        |
| 5.5      | <b>Análise estatística</b> .....                             | 41        |
| <b>6</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                          | <b>42</b> |
| 6.1      | Caracterização dos genes .....                               | 42        |
| 6.1.1    | <b>Extração de RNA total</b> .....                           | 42        |
| 6.1.2    | <b>PCR em tempo normal</b> .....                             | 43        |
| 6.2      | Análise da expressão gênica .....                            | 44        |
| 6.2.1    | <b>PCR em tempo real</b> .....                               | 44        |
| 6.2.2    | <b>Curva de diluição</b> .....                               | 47        |
| 6.2.3    | <b>Cálculo da eficiência da amplificação dos genes</b> ..... | 49        |
| 6.2.4    | <b>Quantificação da expressão gênica</b> .....               | 49        |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....                                      | <b>54</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                     | <b>55</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Em sistemas de produção de bovinos de corte, a reprodução é um fator determinante, uma vez que, os aspectos reprodutivos interferem na lucratividade dessa atividade (OLIVEIRA et al., 2003).

Muita ênfase tem sido dada em se diminuir a idade de novilhos ao abate. Porém, o maior impacto sobre a taxa de desfrute do rebanho brasileiro seria não somente diminuir a idade ao abate, como também diminuir a idade ao primeiro parto das fêmeas. Um sistema produtivo baseado na primeira parição aos quatro anos significa taxas de desfrute abaixo dos 15% e várias categorias de fêmeas vazias em recria. A primeira parição aos 36 meses implica duplicar a taxa de desfrute. Pensar na primeira parição aos 27 meses significa estar perto dos 40% de taxa de desfrute (FRIES et al., 1996).

O início da atividade reprodutiva em fêmeas de corte tem grande influência na rentabilidade da criação de bezerros de reposição. A raça Nelore (*Bos taurus indicus*), apesar de bem adaptada às condições tropicais, atinge a puberdade em idade bem mais avançada que raças européias, mesmo quando estas são criadas em condições semelhantes (RODRIGUES et al., 2002).

A idade média ao primeiro parto em rebanhos do estado de São Paulo encontra-se ao redor de 34 meses de idade, correspondendo a uma idade à concepção de 25 meses. Mesmo quando as novilhas são expostas aos touros desde os 14 meses de idade, a concepção ocorre somente ao redor de 25 meses de idade (PEREIRA et al., 2002).

Este atraso na reprodução das fêmeas leva a um aumento de tamanho do rebanho não produtivo, redução na taxa de desfrute e, conseqüentemente, baixa eficiência do sistema de criação de bezerros de reposição. O longo período não produtivo em que as vacas permanecem na propriedade encarecem o custo de produção de bezerros e atrasa o processo de seleção genética do rebanho (RESTLE et al., 1999).

A idade ao primeiro parto depende da idade à puberdade, sendo esta influenciada por diversos fatores externos, como nutrição e estação do ano. Porém, o peso médio à puberdade da raça Nelore também é superior ao de raças européias, demonstrando que, além do ambiente, a genética também é responsável

pela diferença na idade à puberdade (THALLMAN et al., 1999; RODRIGUES et al., 2002).

Em novilhas *Bos taurus indicus* (RODRIGUES et al., 2002), o início da puberdade é regulado pela maturação do hipotálamo (teoria "gonadostática"). Anteriormente à puberdade, os pulsos de hormônio luteinizante (LH) são pouco freqüentes, devido à inibição do estrogênio à secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo. Com a aproximação da puberdade, a maturação do hipotálamo resulta em um decréscimo da inibição do estrogênio na secreção de GnRH, o que leva a maior freqüência nos pulsos de LH e eventual ovulação (KINDER et al., 1995). A regulação fisiológica da maturação do hipotálamo não é bem compreendida (KINDER et al., 1995). Claramente, tanto o peso vivo quanto a condição corporal influenciam a idade à puberdade (MORAN et al., 1989). Recentemente tem sido postulado que um hormônio produzido pelo tecido adiposo, a leptina, age como sinalizador da condição corporal do animal ao hipotálamo, e, através de ligação com receptores no hipotálamo, exerce um efeito permissível à obtenção da puberdade (SPICER, 2001).

Estudos têm demonstrado que, em baixas condições nutricionais, os níveis de leptina e gonadotrofinas são relativamente baixos, sendo revertida as concentrações de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) após aplicação exógena desse hormônio (NAGATANI et al., 1998). Há relevantes evidências de que a leptina (em carência ou em excesso) é o sinal metabólico para inibir a atividade reprodutiva em condições nutricionais deficientes e reservas energéticas inadequadas (CUNNINGHAM et al., 1999).

O conhecimento dos mecanismos moleculares que controlam o sistema reprodutivo, bem como suas interações com outros sistemas, pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o processo de seleção genética e de terapias para aumentar a fertilidade (PEREIRA, 2003).

A nossa hipótese, neste estudo, é a de que a obtenção da puberdade em novilhas Nelore decorre da sinalização pela leptina no hipotálamo. Novilhas mais precoces podem ser detectadas por meio da expressão de determinados genes cujas proteínas codificadas têm ação no hipotálamo.

Neste contexto, objetivou-se neste trabalho identificar e estudar a expressão de genes (que codificam proteínas com ação no hipotálamo) em dois grupos de novilhas Nelore, precoce (ciclado) e não precoce (não ciclado) que podem estar

relacionados com o controle da puberdade utilizando-se a metodologia de RT-PCR em tempo real.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste item será descrita a revisão de literatura referente ao presente trabalho.

### 2.1 Raça Nelore

Atualmente, o Brasil detém a posição de principal exportador mundial de carne bovina, contando com um rebanho de 170 milhões de cabeças, das quais 80% são de animais zebuínos ou cruzados com zebu, sendo que 90 milhões são da raça Nelore. A grande importância desta raça para a pecuária nacional é consequência de características específicas que incluem rusticidade e adaptação ao sistema de criação extensivo com baixo custo (NOGUEIRA, 2004).

A raça, originalmente utilizada para exploração leiteira na Índia, foi selecionada no Brasil para a produção de carne. Com excelente capacidade de digestão, resistência natural aos parasitas externos e metabolismo mais baixo que o do gado europeu, o Nelore se adaptou bem às condições de criação extensiva nos trópicos (ACNB, 2006).

Diversos estudos permitiram concluir que existem diferenças na idade e peso corporal à puberdade entre as várias raças de bovinos. Em geral, os bovinos de origem européia *Bos taurus taurus*, atingem a puberdade mais precocemente do que os de origem zebuína *Bos taurus indicus* (THALLMAN et al., 1999). O atraso no início da puberdade em bovinos de raças de origem zebuína se reflete na idade à primeira cria, que nesses animais pode ser aos 40 meses de idade ou mais tardiamente (NOGUEIRA, 2004).

A energia é o nutriente que mais afeta a reprodução em fêmeas bovinas. A ingestão insuficiente de energia está correlacionada com um baixo desempenho reprodutivo, atraso na idade à puberdade, atraso no intervalo da primeira ovulação e cio pós-parto, e redução nas taxas de concepção e de prenhez em vacas de corte e de leite (SANTOS, 1998). A baixa idade à puberdade é otimizada por um bom aporte nutricional. Inversamente, uma nutrição inadequada pode alterar de maneira

negativa a liberação de LH, provavelmente pela modulação de GnRH no hipotálamo. (SCHILLO et al., 1992).

O peso corporal é o principal fator que afeta o início da puberdade em bovinos. Portanto, o acompanhamento do ganho de peso diário e a avaliação do peso corporal, tornam-se duas alternativas de grande utilidade, para a predição deste evento, principalmente no que diz respeito à caracterização de fêmeas que estão aptas à sua primeira estação reprodutiva (MARSON et al., 2004).

Yelich et al. (1996) observaram que a restrição alimentar prolongada atrasa o início da puberdade o que prejudica a atividade cíclica de novilhas, por suprimir a liberação do LH em pulsos de alta frequência, necessários para o crescimento dos folículos ovarianos até o estágio pré-ovulatório.

A restrição nutricional também afeta as concentrações de progesterona no período pré-puberal e nos primeiros dias do ciclo estral, mesmo se os níveis nutricionais forem incrementados próximos ao momento do surgimento da puberdade (PERON; FERNANDEZ, 1995).

## 2.2 Puberdade

A puberdade pode ser definida como o primeiro estro acompanhado pelo desenvolvimento de um corpo lúteo capaz de se manter durante um ciclo estral completo (KINDER et al., 1987).

Do ponto de vista prático, um animal atinge a puberdade quando é capaz de liberar gametas e de manifestar todas as etapas envolvidas no comportamento sexual (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Em condições de reprodução normal (saúde e nutrição controladas), dependendo da subespécie (*Bos taurus taurus* ou *Bos taurus indicus*), a puberdade ocorre geralmente entre 12 e 24 meses de idade. A idade à puberdade é influenciada pelo ambiente, idade, genética, peso e por níveis de crescimento antes e após o desmame (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Associada a idade também há uma necessidade da maior disponibilidade de energia, glicose, insulina e leptina aumentando a sinalização para hipotálamo de que há um balanço energético favorável para o início da atividade reprodutiva (NOGUEIRA, 2003).

O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em padrão rítmico de baixa frequência. Em consequência, a hipófise libera na corrente sanguínea o LH com uma relação temporal praticamente idêntica àquela apresentada pelo GnRH. Assim, os níveis séricos de LH se mantêm baixos, não sendo suficientes para deflagrar o início da puberdade. Este padrão de secreção hipotalâmica é mantido principalmente pela ação inibitória exercida pelo estradiol de origem ovariana (FOSTER, 1994).

A gradativa diminuição do "feedback" negativo exercido pelo estradiol desencadeará a maturação hipotalâmica, devido a uma diminuição do número de receptores do estradiol no hipotálamo e na adenohipófise (DAY et al., 1987).

O fator endócrino primário, necessário ao desencadeamento da puberdade em novilhas é a gradativa redução da sensibilidade do hipotálamo aos efeitos inibitórios do estradiol, que desencadeia o aumento na frequência de pulsos de LH e resulta em crescimento folicular, produção de estradiol, que por sua vez induz o comportamento estral e a liberação da onda pré-ovulatória de LH, que induzirá a ovulação (RAWLINGS et al., 2003).

No entanto, também se sugere que o hormônio responsável por regular a liberação de GnRH, refletindo o estado nutricional e as reservas energéticas é um hormônio derivado dos adipócitos, a leptina. A redução na frequência de pulsos de LH devido à restrição alimentar pode provocar a diminuição nas concentrações da leptina sérica. Este hormônio é proposto como regulador do metabolismo energético e um dos mediadores dos efeitos sobre o desenvolvimento do sistema reprodutivo, sendo altamente correlacionado com a concentração sérica no início da puberdade e com o peso corporal ( $R^2 = 0,85$ ) (WILLIAMS et al., 2002).

Segundo Galina et al. (2000) foi demonstrado que, em baixas concentrações nutricionais, os níveis de leptina e gonadotropinas estão relativamente baixos, sendo revertidas as concentrações de FSH e LH após aplicação exógena deste hormônio. Assim, há relevantes evidências de que o baixo nível de leptina circulatória é o sinal metabólico para inibir a atividade reprodutiva em condições nutricionais deficientes e reservas energéticas inadequadas (CUNNINGHAM et al., 1999).

A incidência da puberdade, bem como do estro não puberal é influenciada por muitos fatores incluindo a idade, o genótipo, a estação do ano, o peso corporal, a nutrição e o ambiente social (GARVERICK; SMITH, 1993). Os efeitos da nutrição com relação ao início da puberdade foram amplamente revisados por Schillo et al.



(1992), demonstrando que são muito importantes, particularmente em novilhas. O ganho de peso adequado é necessário para que novilhas atinjam a puberdade e continuem a apresentar ciclos estrais normais. A subnutrição, tanto quanto a superalimentação influem significativamente (talvez sejam os principais fatores) nas anomalias do estabelecimento da puberdade em novilhas. A subnutrição dos animais em fase de crescimento determina retardo na puberdade, baixas taxas de concepção, subdesenvolvimento da glândula mamária e redução na produção leiteira (PATTERSON et al., 1992).

### 2.3 Leptina

A leptina é um hormônio peptídico secretado pelos adipócitos e que possui ação na regulação do peso corporal e ingestão de alimentos. Recentemente tem sido relacionada com a interação nutrição e reprodução. Esse hormônio é encontrado em muitas áreas do cérebro e outros tecidos, incluindo os ovários (BOLAND et al., 2001).

A descoberta da leptina foi feita em camundongos geneticamente obesos, deficientes em leptina e estéreis (ZHANG et al., 1994). A injeção intraperitoneal de leptina exógena eliminou os defeitos de esterilidade, e machos e fêmeas tiveram o seu sistema reprodutivo ativado. Os diferentes estudos em roedores não apenas confirmam o papel da leptina na fisiologia da puberdade e reprodução, como também demonstram que estes efeitos não são somente secundários aos efeitos no balanço energético e do acúmulo de gordura (SPICER, 2001).

Tem sido demonstrado que a leptina pode contribuir para regulação do metabolismo energético, comportamento no consumo de alimentos e reprodução em muitas espécies de animais ruminantes ou não, pode também participar de importantes eventos, inclusive a puberdade (WILLIAMS et al., 2002).

O possível mecanismo de regulação da reprodução pela leptina envolve inter-receptores de leptina nos neurônios, que provocam liberação de alfa-endorfinas, as quais têm impacto sobre os neurônios secretores de GnRH e do neuropeptídeo Y (envolvido no controle da saciedade), além de sensibilizar regiões do cérebro, sensíveis à glicose, as quais influenciam a secreção de GnRH (CUNNINGHAM et al., 1999). A leptina pode também possuir efeito local,

possivelmente regulando o tamanho dos folículos e qualidade dos ovócitos (BOLAND et al., 2001). Observações feitas por Cunningham et al. (1999), sugeriram que a leptina representa um sinal metabólico para o sistema reprodutivo neuro-endócrino e que, sob condições inadequadas de reserva energética, baixos níveis de leptina atuam como uma “chave metabólica” a fim de inibir a atividade reprodutiva no eixo neuro-endócrino em ambos os sexos.

A leptina tem efeito inibitório ou estimulatório sobre a liberação de GnRH e este efeito pode ser dependente da dose, meio de cultura, espécie ou sexo. Hipoteticamente, uma vez encontrado o nível mínimo de leptina, atua como um "gatilho" para iniciar a secreção de gonadotrofinas no hipotálamo-hipófise, enquanto altos índices de leptina não têm efeito (obesidade) (WILLIAMS et al., 2002).

Estudos recentes demonstraram que a expressão do gene da leptina e a leptina circulante respondem positivamente em curto prazo ao fluxo de nutriente e estão associadas com mudanças na insulina, IGF-I e nos pulsos de LH (GARCIA et al., 2002). Além disso, a administração central de leptina recombinante ovina estimulou significativamente a insulina pancreática e a secreção de LH em vacas adultas, em jejum e em animais bem alimentados (AMSTALDEN et al., 2002; MACIEL et al., 2004).

Maciel et al. (2004), demonstraram a habilidade da administração periféricamente de leptina ovina recombinante para prevenir a diminuição na frequência dos pulsos de LH em novilhas bem nutridas as quais estavam cerca de dias ou semanas de suas primeiras ovulações.

Trabalhos anteriores em suínos, primatas e roedores têm também associado à administração de leptina a mudanças na secreção de LH e GH. Em ovelhas, a administração central e periférica da leptina pode estimular o LH e GH em animais em jejum ou em animais restritos à alimentação, e GH em animais bem nutridos (MORRISON et al., 2002).

Coletivamente, estas observações sugerem que a leptina desenvolve uma importante função como um 'link' (ou elo) entre o "status" nutricional e o eixo central reprodutivo em bovinos.

## 2.4 Mecanismos moleculares de ação da leptina no hipotálamo

A leptina atua no hipotálamo e possui ação anorexígena (inibidora de apetite). Os receptores de leptina são encontrados em grande número no hipotálamo, e em outras regiões do sistema nervoso central (ELMQUIST et al., 1998).

Segundo Williams et al. (2002), os receptores da leptina têm sido encontrados no arco do hipotálamo e núcleo ventromedial em todas as espécies que já foram estudadas, áreas envolvidas no comportamento ingestivo, reprodução e crescimento. Os receptores são encontrados na forma longa (OB-Rb) e curta (OB-Ra). A forma longa é encontrada em várias regiões do cérebro e a forma curta nos demais tecidos (adiposo, gástrico, gônadas, placenta, etc) (HOSSNER, 1998; HOUSEKNECHT et al., 1998). Esses receptores são coexpressados nos neurônios hipotalâmicos que expressam a Pro-opiomelanocortina (POMC). Exemplos de hormônios derivados desta proteína são: a  $\beta$ -endorfina, a adrenocorticotropina (ACTH) e o neuropeptídeo Y (NPY) (RIVIER; RIVEST, 1991). A sinalização da leptina depende de sua ligação a um receptor monomérico trans-membrana da família dos receptores de citocina da classe I (TARTAGLIA et al., 1995).

Seis diferentes formas protéicas ("*splice variants*") deste receptor foram descritas, sendo chamadas de Ob-Ra - Ob-Rf (STEPANYAN et al., 2003). A forma Ob-Rb é aquela expressa de forma predominante em neurônios do núcleo arqueado, sendo, de acordo com a maior parte dos estudos, a principal responsável pela transdução do sinal da leptina nesta região anatômica (TARTAGLIA, 1997). Como outros membros da família de receptores da classe I de citocinas, o Ob-Rb (assim como os demais Ob-Rs) não possui atividade catalítica intrínseca, sendo constitutivamente ligado a uma proteína citosólica com atividade tirosina quinase chamada Janus quinase 2 (JAK-2).

A modificação conformacional induzida pela ligação da leptina e pela dimerização de receptores induz a atividade catalítica da enzima JAK-2 associada, a qual se autofosforila em vários resíduos tirosina, tornando-se assim ativa para que, a seguir, fosforile e ative a outra molécula de JAK-2 ligada ao segundo receptor (TARTAGLIA, 1997). Subseqüentemente, as JAK-2 ativas catalisam a fosforilação

dos receptores Ob-Rb nas tirosinas 985 e 1138 (MUNZBERG; MYERS, 2005). Desta forma, criam-se três sítios ativos que darão continuidade ao sinal da leptina.

O primeiro sítio encontra-se na molécula de JAK-2 fosforilada. O segundo sítio encontra-se na adjacência do resíduo tirosina 985 fosforilado no Ob-Rb. Por fim, o terceiro sítio encontra-se nas adjacências da tirosina 1138 do Ob-Rb fosforilado. Este sítio promove o recrutamento de moléculas da família de transdutores-de-sinal-e-ativadores-de-transcrição (STATs, predominantemente STAT3) responsáveis por conduzir o sinal gerado pela leptina ao núcleo, onde coordenarão a transcrição de genes de neurotransmissores responsivos ao sinal hormonal (BJØRBAEK et al., 2004). *In vitro*, a leptina mostrou ativar STAT1, STAT2, STAT3, STAT5 e STAT6; contudo, no hipotálamo, a leptina ativa especificamente STAT3 (VAISSE et al., 1996).

## 2.5 SOCS-3

A leptina relaciona-se estruturalmente a citocinas e age em receptores que pertencem à superfamília de receptor de citocina (BJØRBAEK et al., 1998). Estudos *in vitro* e *in vivo* verificaram que a leptina ativa a transferência de sinal igual ao da citocina ao estimular o caminho JAK – STAT por meio do receptor de forma longa de leptina (BAUMANN et al., 1996).

Em conseqüência da estimulação da leptina, JAKs intracelulares são ativadas pro meio de transfosforilação e resíduos de tirosina fosforilados no receptor de leptina de forma longa e em transdutores e ativadores de proteínas de transcrição (STAT). Proteínas STAT fosforiladas dimerizam e translocam para o núcleo a fim de ativar a transcrição do gene (BJØRBAEK et al., 1999).

Recentemente, uma nova família de inibidores induzíveis de citocina de sinalização foi identificada, incluindo CIS (seqüência induzível de citocina), SOCS -1 (supressor de sinalização de citocina), SOCS-2 e SOCS-3 (YOSHIMURA et al., 1995). Membros da superfamília de citocina incluindo a leptina, interleucina-6, interferon-alfa, fator inibidor da leucemia, eritropoetina e hormônio de crescimento induzem a transcrição *in vitro* e *in vivo* de um ou mais genes de *cis* e *socs*, e quando

expressos em células, as proteínas CIS e SOCS inibem a sinalização e as atividades biológicas das citocinas (STARR et al., 1997).

As citocinas incluem uma grande família de glicoproteínas que regulam processos biológicos fundamentais incluindo hematopoiese, imunidade e o desenvolvimento do sistema nervoso. Embora os receptores de citocina não tenham atividade intrínseca de quinase, eles associam-se de forma constitutiva com membros da família Janus quinase (JAK) de quinases de tirosina, que inclui TYK2, JAK1, JAK2 e JAK3 (KREBS; HILTON, 2001).

SOCS-3 (também conhecido como CIS3) é uma proteína que contém domínio SH2 que inibe a sinalização por determinado receptor de citocina – complexos Jak quinase (STARR et al., 1997). A leptina induz a expressão de RNAm de SOCS-3 em regiões do hipotálamo que expressam a forma longa do receptor da leptina via transcrição mediada por STAT3, SOCS-3 inibe a sinalização da forma longa do receptor da leptina e níveis celulares de SOCS-3 são elevados em células de resistência à leptina e nos hipotálamos de alguns animais obesos (BJØRBAEK et al., 1999; BANKS et al., 2000). Assim, SOCS-3 é um provável mediador de inibição de resposta sobre o receptor de leptina e um mediador potencial de resistência fisiológica à leptina (MASUHARA et al., 1997).

## 2.6 NPY

A ocorrência do neuropeptídeo Y (NPY), um membro da família dos peptídeos pancreáticos foi originalmente identificado por Tatemoto em 1982. Desde então, uma grande evidência tem demonstrado um papel importante do NPY em muitas funções neuroendócrinas (TATEMOTO, 1982). O neuropeptídeo Y (NPY) é sintetizado no núcleo arqueado do hipotálamo e parece controlar funções metabólicas tais como absorção de alimento e termogênese, e também parâmetros reprodutivos como comportamento sexual ou secreção de gonadotropina (AUBERT et al., 1998; BARB, 1999). O núcleo arqueado do hipotálamo contém populações de neurônios que expressam neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo relacionado à cepa *'agouti'* (AGRP-*agouti-related protein*) e o precursor pró-ópio-melanocortina (POMC) (FRIEDMAN; HALAAS, 1998).

O neuropeptídeo Y (NPY) contém 36 resíduos de aminoácidos, incluindo uma tirosina em cada extremidade (assim Y, o código para Tirosina). NPY é um dos peptídeos mais abundantes do hipotálamo e um dos fatores orexígenos mais potentes (WILLIAMS et al., 2000).

As várias funções de NPY são mediadas pela família de gene receptor Y, consistindo de pelo menos cinco membros distintos (Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6). Além do seu envolvimento em reprodução e energia homeostática, estes receptores Y quando ativados por suas ligações, NPY, peptídeo YY (PYY) e polipeptídeo pancreático (PP), também podem modular outras funções fisiológicas importantes incluindo ritmia cardíaca, motilidade gastrointestinal, memória, ansiedade, e pressão sanguínea (GEHLERT, 1999).

Estes receptores NPY são encontrados com padrões de contribuições individuais em muitos neurônios hipotalâmicos incluindo neurônios motores, neuroendócrinos, neurônios neurosecretórios magnocelulares e numerosos neurônios que ligam o hipotálamo com os sistemas nervosos límbicos e autonômicos (FETISSOV et al., 2004).

O papel da leptina e do neuropeptídeo Y na regulação da função reprodutiva, ou como uma ação coordenada de ambos os fatores, ou com cada fator agindo independentemente, foi avaliado durante maturação sexual na rata (AUBERT et al., 1998). O RNAm do NPY é expresso em ratos *ob/ob*, os quais não produzem uma forma funcional da leptina; conseqüentemente, ratos *ob/ob* são obesos, hiperfágicos e inférteis. O tratamento de ratos *ob/ob* com leptina exógena diminuiu a expressão de RNAm do NPY no interior do núcleo arqueado, restaurou estes animais de modo relativo a uma condição corporal normal e aprimorou diversos parâmetros reprodutivos (DYER et al., 1997).

## 2.7 NPY-Y1

O receptor de NPY, NPY-Y1 foi o primeiro a ser clonado em ratos e subseqüentemente em humanos e camundongos. O primeiro modelo de respostas mediadas de NPY-Y1 é uma vasoconstrição (LUNDBERG; TATEMOTO, 1982). Porém, este receptor foi envolvido em várias outras respostas induzidas de NPY, tais

como a estimulação de absorção de alimento e ativação de eixos neuroendócrino (PEDRAZZINI, 2004). No sistema reprodutivo masculino e feminino, artérias e arteríolas apresentam uma expressão significativa de Y1 (MATSUDA et al., 2002).

O receptor NPY-Y1 pertence à família de receptores de proteína G-unida que tem características distintas de ligação–união (LEUPEN et al., 1997). É considerado como um pós sináptico e media muitas das ações de NPY em tecidos periféricos (WAHLESTEDT et al., 1986).

Em outras séries de experiências, a importância de um subtipo Y1 em mediar os caminhos de leptina envolvidos no controle da puberdade foi avaliada. Camundongos jovens foram tratados com injeções diárias de leptina (PRALONG et al., 2002). Um avanço de puberdade foi observado em '*knockouts*' (interrupção do gene) NPY-Y1<sup>-/-</sup> tratados com leptina. Além disso, a inibição de eixo gonadotrópico foi estudada em camundongos (*ob/ob*) deficientes em leptina. De forma interessante, as sinalizações de eixo reprodutivo de camundongos (*ob/ob*) produzindo uma mutação inativa no locus Y1 foram normais, sugerindo que as ações do NPY referentes às funções reprodutivas são mediadas pelo receptor NPY-Y1 (PEDRAZZINI, 2004).

## 2.8 NPY-Y4

O receptor Y4 é predominantemente expresso em tecidos periféricos, tais como, pâncreas, intestino, cólon, coração e fígado (BARD et al., 1995; LUNDELL et al., 1995). Porém, quantidades significantes de RNAm de Y4 e locais específicos de ligação também foram encontradas em áreas – chaves do hipotálamo, tais como, núcleo paraventricular e em certos núcleos do sistema nervoso central, incluindo a área postrema e o núcleo do trato solitário (PARKER; HERZOG, 1999; LARSEN; KRISTENSEN, 2000).

Em princípio, pensava-se que o receptor Y4 era principalmente um receptor periférico porque ele se une a um polipeptídeo pancreático periféricamente com uma afinidade muito maior do que a do NPY (CAMPBELL et al., 2003).

De acordo com Saintsbury et al. (2002) os receptores Y4 estão especificamente envolvidos na inibição da função reprodutiva e fertilidade debilitada

observadas em camundongos (*ob/ob*) com deficiência de leptina. Isto provavelmente ocorre devido à ativação mediada por NPY de receptores Y4 nas regiões do cérebro que controlam o eixo gonadotrópico. Ao contrário, outros aspectos de obesidade em camundongos *ob/ob* tais como defeitos em lactação, assim como hiperfagia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, e massa adiposa aumentada são mais provavelmente não mediados pelo agonismo de receptor Y4. Em fisiologia normal, o receptor Y4 pode contribuir para reduzir a capacidade reprodutiva quando a expressão hipotalâmica NPY é aumentada, tais como, em restrição alimentar, exercícios pesados, lactação e diabetes *mellitus* tipo1, representando um novo alvo possível para o tratamento da infertilidade.



### **3 HIPÓTESE**

O início mais precoce da maturidade sexual pode ser definido em função da maior sensibilização do hipotálamo à sinalização da leptina. Esta maior sensibilidade pode ser ocasionada por menor expressão de SOCS-3, menor expressão de NPY ou de seus receptores: NPY-Y1 e NPY-Y4.

## 4 OBJETIVOS

Neste item serão abordados o objetivo geral e os objetivos específicos deste experimento.

### 4.1 Objetivo Geral

Identificar genes cuja expressão protéica com ação no hipotálamo contribua para a precocidade sexual de novilhas da raça Nelore.

### 4.2 Objetivos Específicos

Avaliar a correlação funcional entre os genes diferencialmente expressos no hipotálamo e as manifestações fisiológicas relacionadas ao estabelecimento da puberdade em novilhas da raça Nelore.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão descritas as etapas da realização do experimento.

### 5.1 Animais

Quinhentas novilhas de um rebanho de 6000 cabeças, a maioria da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), nascidas no mês de janeiro de 2001 e provenientes da Estação Experimental Agrozotécnica Hildergard Georgina Von Pritzelwitz pertencente à Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, localizada no município de Londrina-PR, foram selecionadas (precoces e não precoces), baseadas em características de raça, idade e peso vivo de aproximadamente 290 Kg. Entre estas novilhas, cem animais foram pesados e submetidos à apalpação retal, para verificar o estágio de desenvolvimento dos ovários. Com base nos resultados da apalpação retal, as novilhas foram divididas em grupos de precoces (com corpo lúteo presente) e não precoces (sem corpo lúteo e com o ovário pequeno). Dez novilhas precoces e dez não precoces foram selecionadas e posteriormente foi aplicada uma dose de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (Ciosin, Coopers). A ocorrência de cio foi monitorada no 3º e 4º dia após a aplicação. No 4º dia, após a aplicação da prostaglandina, as novilhas foram novamente pesadas e submetidas à apalpação retal para confirmar a ausência de corpo lúteo e o tamanho dos ovários das novilhas do grupo tardio. Com base no peso vivo e tamanho dos ovários, 6 novilhas não precoces e 6 novilhas precoces foram selecionadas para abate e coleta de amostras no dia seguinte. O abate foi realizado no frigorífico localizado em Londrina, PR. No momento do abate, o hipotálamo foi coletado e congelado rapidamente em nitrogênio líquido, e mantido à  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração do RNA total. Dentre estas 12 novilhas, no momento da coleta, foi perdido um hipotálamo de um animal.

## 5.2 Localização do hipotálamo

O hipotálamo foi coletado tendo como base o quiasma óptico e posterior os corpos mamilares.

O gene NKX2.1, também chamado de TITF1 (Fator - 1 da transcrição específica da tireóide), é expresso pelo pulmão, tireóide e pelo hipotálamo (SUSUKI et al., 1998). Por ser expresso no cérebro somente no hipotálamo e não estar envolvido com os eventos reprodutivos, o NKX2.1 foi utilizado como marcador do hipotálamo, ou seja, para normalizar erros no momento da coleta da amostra de hipotálamo.

## 5.3 Análise de expressão gênica

Neste item será descrita toda a análise da expressão gênica realizada neste experimento.

### 5.3.1 Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Morfofisiologia Molecular - ZAB - FZEA (USP).

### 5.3.2 Extração do RNA Total

O isolamento do RNA total dos tecidos foi realizado segundo o protocolo descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). Os tecidos coletados foram dissolvidos em *TRIZOL* (Gibco/BRL), e aliqotados em tubos eppendorfs, finalizando o volume de 1mL. À essa mistura foi adicionado 200  $\mu$ L de clorofórmio, agitado vigorosamente e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente (25°C). Após centrifugação a 12000 Xg por 15 minutos, a 4°C, a fase aquosa foi recuperada e à esta foram adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol, seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugadas a 10000 Xg, por 10 minutos, a 4°C e o precipitado de RNA lavado com 1mL de etanol 75%, sendo procedida uma nova centrifugação a 10000 Xg, por 5 minutos a 4°C. O precipitado de RNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 20  $\mu$ L com água tratada (DEPC) para posterior determinação da concentração de RNA total por espectrofotômetro. As amostras obtidas com esse procedimento foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do RNA total.

### 5.3.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o Kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen).

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 5  $\mu$ g de RNA total das amostras de tecidos, 1 $\mu$ L de oligonucleotídeo iniciador (*primer*) oligo (dT) a 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L; 1  $\mu$ L de dNTP 10 mM. Após a incubação a 65° por 5 minutos, a reação foi resfriada em gelo por 1 minuto. A essa mistura foram adicionados 2  $\mu$ L de tampão *RT 10X*, 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  5mM, 2  $\mu$ L de DTT 0,1 M e 1  $\mu$ L de *Rnase OUT* (40u/ $\mu$ L) em um volume final de 20  $\mu$ L. A reação foi incubada a 42°C por 2 minutos e adicionada 1 unidade da enzima *SuperScript II RT* (Invitrogen). A transcrição reversa foi feita a 42°C por 50 minutos, procedendo-se a inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. Para remover o RNA molde da molécula híbrida cDNA: RNA foi feita digestão com 1 unidade de *Rnase H* por 20 minutos a 37°C.

### 5.3.4 Desenho dos *primers*

Após a escolha dos genes, foi utilizado o software *Primer Express*® v2.0 da *Applied Biosystems* para o desenho dos *primers*. As seqüências obtidas foram feitas com base no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando-se do programa BLAST- Basic Local Alignment Search Tool (Tabela 1).

Tabela 1 – Seqüência, acesso genbank e tamanho dos fragmentos amplificados em cada par de primer desenhado

| Genes  | Seqüência (5' → 3')                                      | Acesso Genbank | Tamanho do fragmento (pb) |
|--------|--|----------------|---------------------------|
| RP-L19 | F- GAAATCGCCAATGCCAAC<br>R- GAGCCTTGTCTGCCTTCA           | NM000981       | 361                       |
| SOCS-3 | F- TTCAGCTCCAAGAGCGAGTACC<br>R- ACTGGATGCGCAGGTTCTTG     | NM174466       | 217                       |
| NPY    | F- CTTGGCCAGATACTACTCAGCG<br>R-AAAGAGGCAGAGACTGGAGAGC    | AY491054       | 200                       |
| NPY-Y1 | F- TGATGCCTTCAAGGACAAATACG<br>R- GGACAGCAGCATGATGTTGATTC | XM580988       | 235                       |
| NPY-Y4 | F- ACCCTGCTTATTGCCAACCTGG<br>R- TGGATTGGTGATGAGCTGATGC   | XM582253       | 210                       |

### 5.3.5 Amplificação de cDNA por PCR

Para cada reação de amplificação dos genes RP-L19, SOCS-3 e NPY foi utilizado 1 µL de cDNA (diluído para 0,05 µL: 1 µL de cDNA e 19 µL de Água Milli-Q estéril), adicionado a 49 µL de reação composto pelos seguintes reagentes: 5 µL de tampão 10X (0,1 mM EDTA, 1mM DTT, 20mM Tris-HCl pH 8,0), 1 µL de dNTP 10mM, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,25 µL de enzima *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 1,25 µL de cada *primer* 10mM (senso e anti-senso), completando com 38,75 µL de

água Milli-Q estéril para o volume final de 50  $\mu$ L. Já para os genes NPY Y1 e NPY Y4 foi utilizado 0,75  $\mu$ L de cada *primer* (senso e anti-senso). As condições da PCR estão descritas na tabela 2. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 1% e visualizados pelos softwares Image FLA-3000G Series versão 1.11 e Image Gauge versão 3.12 (Fuji Film).

Tabela 2 – Programa utilizado na amplificação dos genes RP-L19, SOCS -3 e NPY

| Etapa            | Temperatura | Tempo         | Número de Ciclos |
|------------------|-------------|---------------|------------------|
| Pré-desnaturação | 94°C        | 3 minutos     | 1                |
| Desnaturação     | 94°C        | 45 segundos   |                  |
| Anelamento       | 55°C        | 30 segundos   | 35               |
| Extensão         | 72°C        | 60 segundos   |                  |
| Extensão Final   | 72°C        | 10 minutos    | 1                |
| Resfriamento     | 4°C         | Indeterminado |                  |

Para os genes NPY Y1 e NPY Y4 foi utilizado o mesmo programa, porém com um número de ciclos de 45 da desnaturação até a extensão.

#### 5.4 Quantificação relativa da expressão gênica

Neste item serão descritas a quantificação relativa da expressão gênica e a análise estatística usada no experimento.

##### 5.4.1 Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Animal - Departamento de Zootecnia - Esalq/Universidade de São Paulo (USP).

#### 5.4.2 Reações de PCR em tempo real

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o mix composto pelos seguintes reagentes: 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTP mix 10mM, 1  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (10mM), 0,8 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25mM, 0,25  $\mu\text{L}$  de BSA (20mg/mL), 0,3  $\mu\text{L}$  da enzima Taq *Platinum* DNA polimerase (5U/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen), 4  $\mu\text{L}$  *Sybr Green I* e 18  $\mu\text{L}$  de Água Mili-Q. As reações foram preparadas adicionando-se 18  $\mu\text{L}$  do mix em cada capilar, seguidos de 2  $\mu\text{L}$  de cDNA em cada reação. Os capilares foram centrifugados a 700 Xg por 5 segundos e colocados no equipamento *LightCycler* (Roche). O programa utilizado para a amplificação das amostras foi composto das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento a 55°C, extensão a 72°C por 10 segundos; seguidos de resfriamento final a 40°C por 30 segundos.

Para a quantificação dos resultados foi empregado o método de quantificação relativa descrita por Pfaffl (2001), uma vez que se desejava saber a diferença de expressão entre os grupos estudados, e não o número absoluto de cópias de cada gene.

A equação abaixo ilustra o método de quantificação relativa escolhido:

$$\text{Equação 1: Razão (R)} = \frac{(E \text{ gene de interesse})^{\Delta\text{Ct alvo (Ct não precoce-Ct precoce)}}}{(E \text{ RP-L19})^{\Delta\text{Ct RP-L19 (Ct não precoce-Ct precoce)}}$$

onde E= eficiência da amplificação de cada gene; Ct= ciclo de início da detecção do produto amplificado;  $\Delta$ = diferença entre amostra desconhecida *versus* o controle.

Esse método citado baseia-se na quantificação do gene de interesse em relação a um gene controle denominado referência ou controle, para que se minimizem as possíveis variações quanto à quantidade de RNA utilizada inicialmente e eficiência na transcrição reversa. Entretanto, para a realização das análises estatísticas, foram considerados os valores individuais de Cts. O método de expressão relativa foi usado para minimizar possíveis variações devido à eficiência da transcrição reversa e a quantidade do modelo utilizado.



### 5.4.3 Eficiência de amplificação

A equação para o cálculo da eficiência de amplificação foi utilizada na forma logarítmica. Relacionando os valores logarítmicos do produto de PCR ( $\text{Log}_2$ ) *versus* o número de ciclos de amplificação, um gráfico linear pôde ser gerado. Este gráfico somente pode ser construído na fase exponencial da reação e é geralmente utilizado para acessar a eficiência de amplificação. As condições de amplificação específica para cada gene foram obtidas levando-se em consideração a qualidade das curvas de dissociação obtidas (Tabela 4).

Para calcular a eficiência de amplificação de todos os genes, foi construída uma curva de diluição em série de cDNA. A partir dos dados obtidos, produziu-se um gráfico do Ct (*threshold cycle* ou quantidade de ciclos necessários para amplificação do gene em questão) *versus* o  $\text{log}_2$  do número relativo de cópias da diluição em série. Regressão linear foi feita para determinar o coeficiente angular da reta, que é usado para determinar a eficiência de amplificação baseando-se na equação 2, descrita por Yuan et al. (2006):

Equação 2: Eficiência =  $2^{(-1/\text{coeficiente angular da reta})}$

### 5.4.4 Escolha do gene controle

A proteína ribossomal L19 (RP-L19) é expressa de forma constitutiva pelos tecidos e será utilizada como controle positivo de amplificação e para normalizar a quantidade de cDNA presente em cada amostra do hipotálamo no estudo da expressão diferencial de genes (CHAN et al., 1987). A obtenção de resultados confiáveis utilizando a metodologia de PCR em tempo real requer correção para variações experimentais. A quantificação de um gene controle ou referência permite a normalização de diferenças na quantidade de RNA ou cDNA em amostras individuais geradas por: (1) diferenças na quantidade e qualidade do material, (2)

diferenças no preparo do RNA e síntese de cDNA. Al-Bader e Al-Sarraf (2005) usaram a metodologia RT-PCR para quantificar os níveis do mRNA de diversos genes a fim de identificar quais os mais apropriados, e concluíram que dentre eles a RP-L19 teve expressão constante, independente do tratamento. Assim, selecionou-se a RP-L19, uma proteína ribossomal para ser usada como gene controle neste trabalho.

## 5.5 Análise estatística

Uma curva de diluição com uma série de concentrações de cDNA foi calculada para cada gene para obter uma eficiência de amplificação. A análise estatística foi realizada utilizando o procedimento MIXED (SAS, 2000) para executar uma regressão linear simples para cada grupo baseado no modelo descrito por Yuan et al. (2006). Os intervalos de confiança para as inclinações foram avaliados. O  $\Delta Ct$  para cada gene (controle ou interesse) foi então calculado subtraindo o número Ct da amostra de interesse (precoce) da amostra controle (não precoce). Quando a eficiência de amplificação não foi diferente do que 1, a razão da expressão do gene foi calculada com a equação: Razão =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , enquanto que  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{RP-L19} - \Delta Ct_{interesse}$ . Os dados foram analisados por meio de uma análise de covariância (ANCOVA), segundo modelo proposto por Yuan et al. (2006), considerando os efeitos fixos de tratamento, gene, e a interação do tratamento x gene, e os efeitos casuais do animal (tratamento) e gene x tratamento (animal). A hipótese nula foi aquela  $GeneAlvo_{n\grave{a}o\ precoce} - RP-L19_{n\grave{a}o\ precoce} = GeneAlvo_{precoce} - RP-L19_{precoce}$ , ou alternativamente:  $(GeneAlvo_{n\grave{a}o\ precoce} - GeneAlvo_{n\grave{a}o\ precoce}) - (RP-L19_{precoce} - RP-L19_{precoce}) = 0$ . O contraste foi usado para contrastar o efeito do tratamento e para estimativa de  $\Delta\Delta Ct$ , tão bem como seu erro padrão da média e intervalo de confiança de 95%.

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

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão discutidas a caracterização dos genes e a análise da expressão gênica.

### 6.1 Caracterização dos genes

Neste item serão discutidas as extrações de RNA total e a PCR em tempo normal do presente experimento.

#### 6.1.1 Extração de RNA total

Para extração do RNA total foram utilizadas amostras dos hipotálamos de 11 animais, sendo 6 novilhas não precoces e 5 novilhas precoces. A extração foi realizada e o RNA total pode ser visualizado na figura 1.

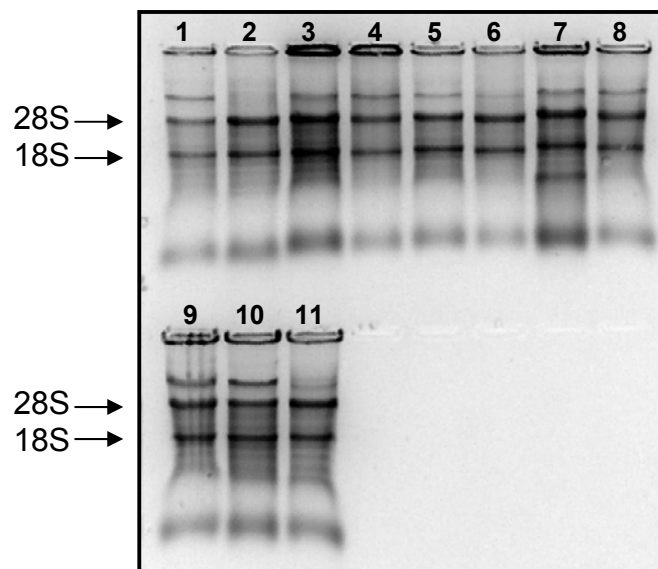


Figura 1 - Gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA total, podendo-se visualizar as bandas estruturais de RNA ribossômico (28S e 18S)

A eletroforese em gel de agarose 1% permitiu verificar a integridade das amostras de RNA total extraídas, avaliadas pelas bandas estruturais do RNA ribossômico. Após a verificação da integridade do RNA total e quantificação em espectrofotômetro, procedeu-se a síntese de cDNA empregado nas análises de expressão gênica.

### 6.1.2 PCR em tempo normal

#### a) Especificidade do *primers*

As condições de PCR em tempo normal utilizadas resultaram em produtos de tamanho esperado de uma única banda para todos os genes, como pode ser visualizado na figura 2.

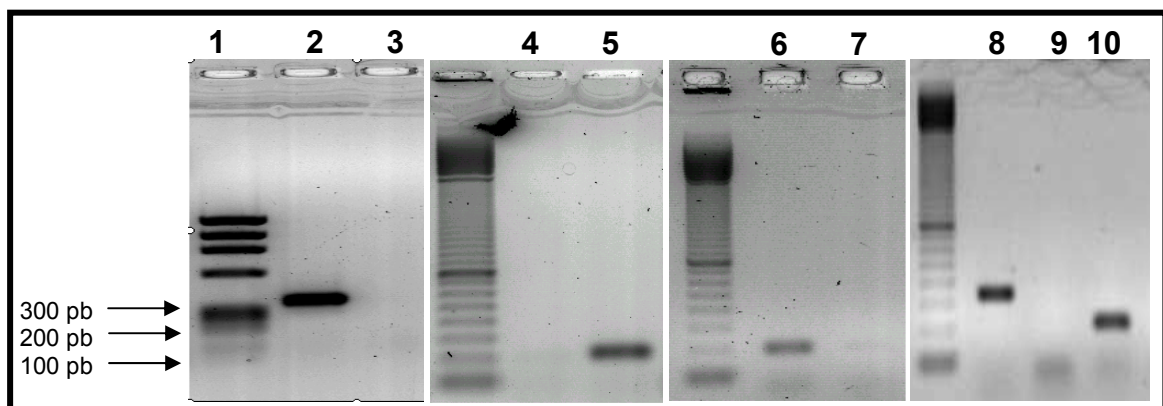


Figura 2 - Gel de agarose 1% para verificação de amplificação dos genes de interesse. Canaleta 1= marcador molecular, Canaleta 2= RP-L19 (361 pb), Canaleta 3= controle negativo, Canaleta 4= controle negativo, Canaleta 5= SOCS-3 (217 pb), Canaleta 6= NPY (200 pb), Canaleta 7= controle negativo, Canaleta 8= NPY-Y1 (235 pb), Canaleta 9= controle negativo e Canaleta 10= NPY-Y4 (210 pb)

A PCR realizada sem adicionar o cDNA (controle negativo), não demonstrou amplificação, afastando a possibilidade de resultado falso-positivo decorrente de contaminação. Este resultado demonstra que as condições de PCR em tempo

normal utilizadas resultaram em produtos de tamanho esperado e amplificação de uma única banda para todos os genes.

## 6.2 Análise da expressão gênica

Neste item serão discutidas a PCR em tempo real, curva de diluição, cálculo da eficiência da amplificação dos genes e quantificação da expressão gênica do experimento.

### 6.2.1 PCR em tempo real

A especificidade dos *primers* foi confirmada também pela análise da curva de dissociação, realizada de 60,0°C a 94,0°C para todos os genes estudados. As representações das análises da curva de dissociação para os genes estão apresentadas nas figuras 3, 4, 5, 6 e 7.

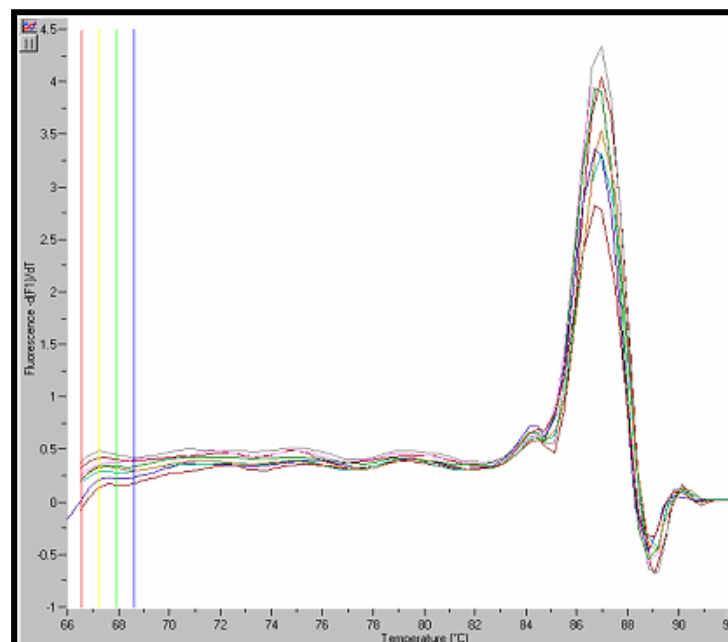


Figura 3 - Curva de dissociação das 11 novilhas para o gene RP-L19. Eixo Y representa a primeira derivada da fluorescência durante cada ciclo e o Eixo X, a temperatura de dissociação. Cada linha representa uma amostra cuja expressão foi quantificada

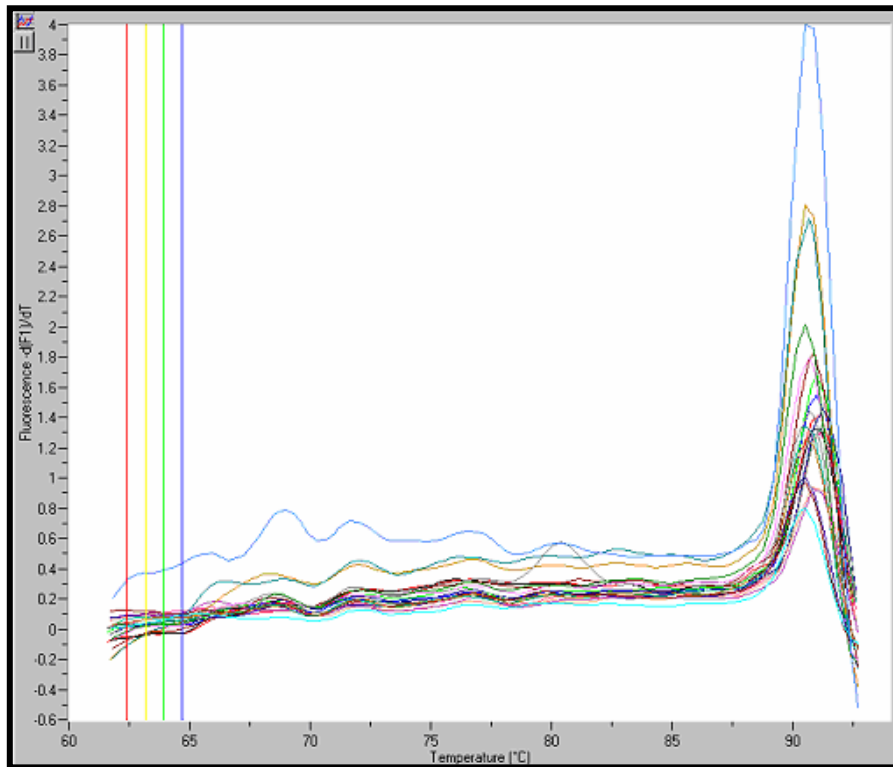


Figura 4 - Curva de dissociação das 11 novilhas para o gene SOCS-3. Eixo Y representa a primeira derivada da fluorescência durante cada ciclo e o Eixo X, a temperatura de dissociação. Cada linha representa uma amostra cuja expressão foi quantificada

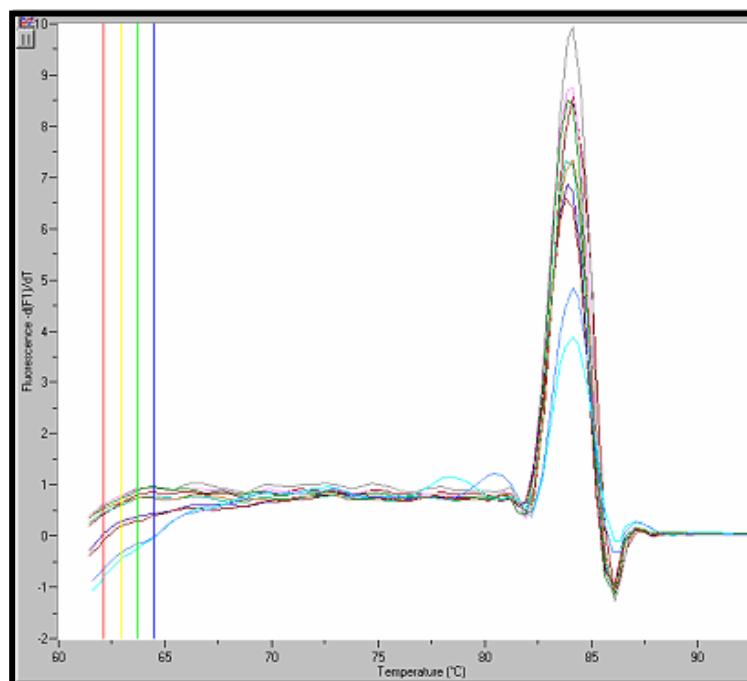


Figura 5 - Curva de dissociação das 11 novilhas para o gene NPY. Eixo Y representa a primeira derivada da fluorescência durante cada ciclo e o Eixo X, a temperatura de dissociação. Cada linha representa uma amostra cuja expressão foi quantificada

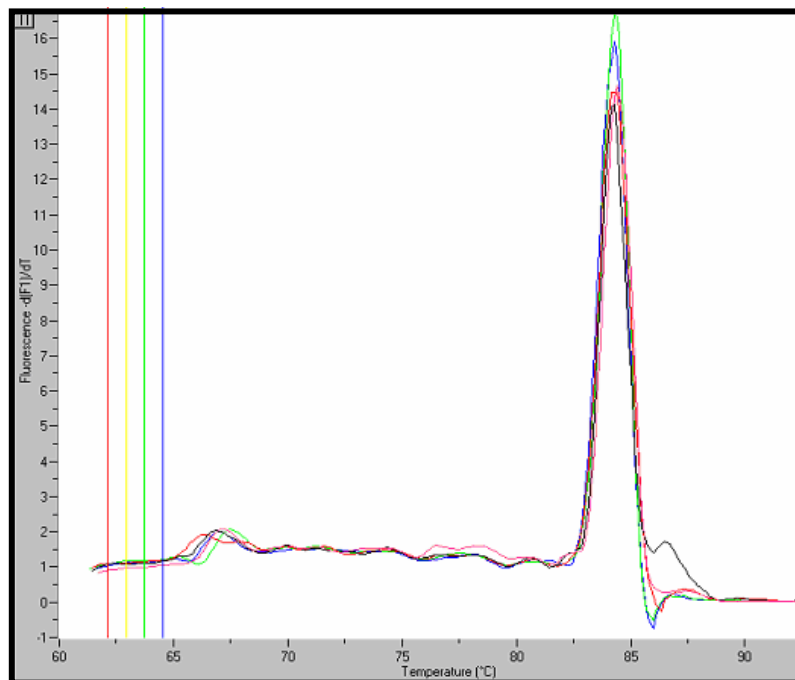


Figura 6 - Curva de dissociação das 11 novilhas para o gene NPY-Y1. Eixo Y representa a primeira derivada da fluorescência durante cada ciclo e o Eixo X, a temperatura de dissociação. Cada linha representa uma amostra cuja expressão foi quantificada

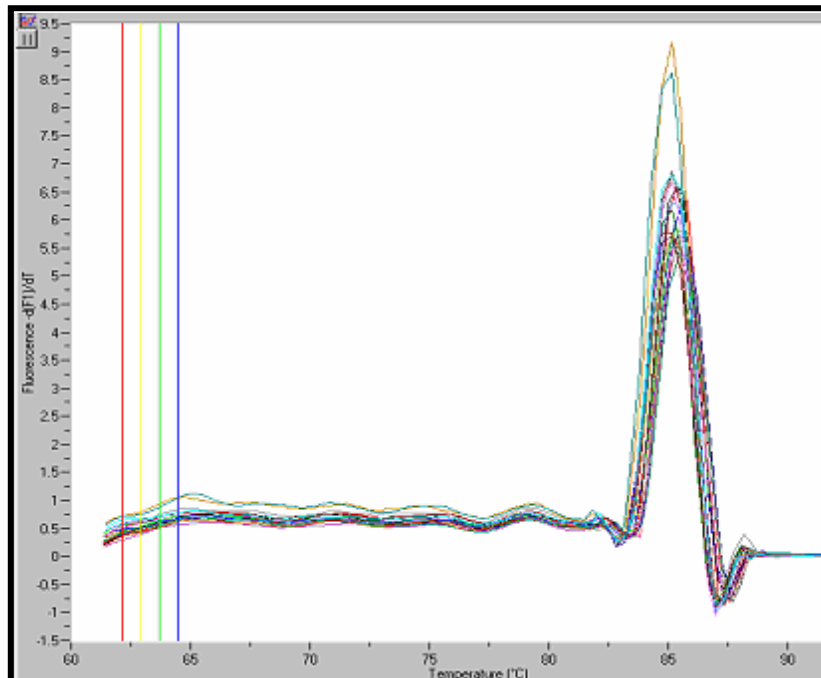


Figura 7 - Curva de dissociação das 11 novilhas para o gene NPY-Y4. Eixo Y representa a primeira derivada da fluorescência durante cada ciclo e o Eixo X, a temperatura de dissociação. Cada linha representa uma amostra cuja expressão foi quantificada

A temperatura de dissociação é aquela na qual os *primers* se separam do DNA molde e foi definida como sendo o pico da curva, o ponto mais alto do platô, a temperatura ideal de acordo com o fragmento amplificado detectado na fluorescência e assim, o ponto central foi definido como temperatura de dissociação. A temperatura de dissociação para todos os genes está apresentada na tabela 3.

Os pontos de dissociação de cada curva apresentada nas figuras representam o sinal de fluorescência devido à amplificação de cada *primer*. A curva apresenta um único pico demonstrando que a amplificação foi específica.

Tabela 3- Temperatura de dissociação

| <b>Genes</b> | <b>Temperatura de dissociação<br/>(°C)</b> |
|--------------|--|
| RP-L19       | 87,0                                       |
| SOCS 3       | 90,0                                       |
| NPY          | 84,0                                       |
| NPY-Y1       | 84,0                                       |
| NPY-Y4       | 85,0                                       |

### 6.2.2 Curva de diluição

Os resultados de eficiência de amplificação foram analisados como descrito anteriormente. Os detalhes estão sumarizados na figura 8.

As análises de regressão revelaram valores acima de 0,96 para o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Desse modo, pôde-se verificar a eficiência de amplificação para cada *primer*, que foi utilizada nos cálculos de expressão relativa.



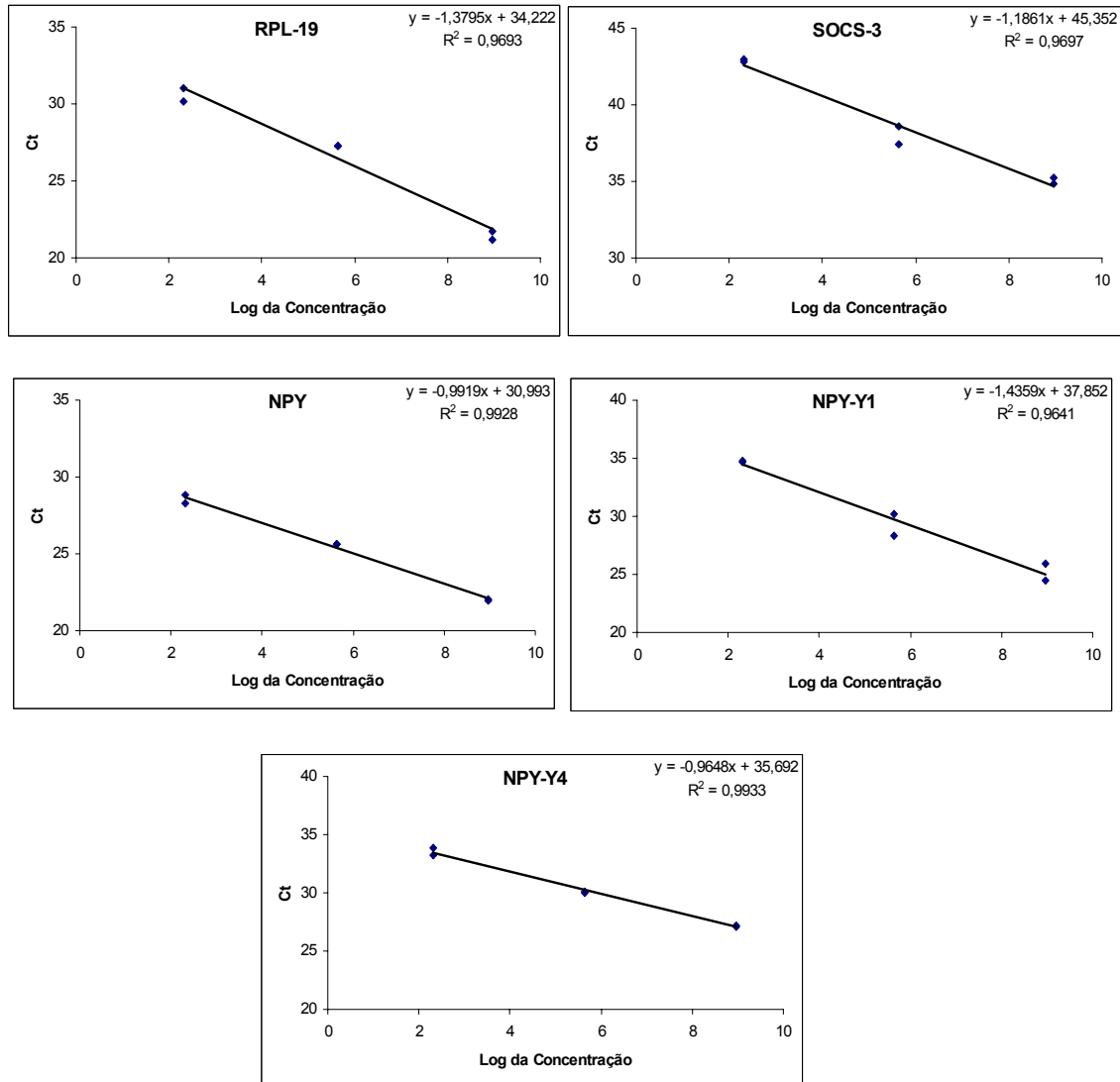


Figura 8 - Curvas de diluição geradas do PCR em tempo real para RP-L19, SOCS-3, NPY, NPY-Y1 e NPY-Y4. Os resultados das análises de regressão (equações e valores de R<sup>2</sup>) são mostrados à direita do gráfico

### 6.2.3 Cálculo da eficiência da amplificação dos genes

De acordo com os resultados obtidos, a eficiência de amplificação entre os genes no coeficiente angular aproximou-se de 2, sendo que a eficiência ideal é =2 (Eficiência =  $2^{-1/\text{coeficiente angular da reta}}$ ). Pode-se notar que a porcentagem de amplificação (PA) para os genes SOCS-3, NPY e NPY-Y4 foi próximo a 1 indicando um resultado significativo, enquanto que para os genes RP-L19 e NPY-Y1 esta porcentagem foi ajustada (Tabela 4).

Tabela 4 - Cálculo da eficiência da amplificação dos genes

| Gene  | Coeficiente angular | IC-95% |        | E   | PA   |
|-------|---------------------|--------|--------|-----|------|
|       |                     | Mínimo | Máximo |     |      |
| NPYY1 | -1,43               | -1,82  | -1,05  | 1,6 | 0,69 |
| RPL19 | -1,37               | -1,71  | -1,03  | 1,7 | 0,72 |
| NPY   | -0,99               | -1,10  | -0,874 | 2,0 | 1,00 |
| NPYY4 | -0,96               | -1,07  | -0,85  | 2,1 | 1,03 |
| SOCS3 | -1,18               | -1,47  | -0,89  | 1,8 | 0,84 |

IC-95% = intervalo de confiança

E = eficiência da amplificação

PA = porcentagem de amplificação

### 6.2.4 Quantificação da expressão gênica

Embora a dissecação do hipotálamo foi preparada de acordo com os marcadores anatômicos, e não deveria haver nenhuma diferença entre os dois grupos de novilhas na área do cérebro que foi tirada uma amostra, decidimos analisar a expressão do marcador do hipotálamo, NKX2.1, também conhecido como TITF1. No cérebro, este gene é somente expresso no hipotálamo e não está envolvido em eventos reprodutivos (SUSUKI et al., 1998). A expressão do NKX2.1

não teve efeito pelo tratamento a qual demonstra que não houve diferença entre os grupos na área do cérebro que foi tirada como amostra.

Não houve efeito de tratamento na expressão do SOCS-3 no hipotálamo ( $P > 0,80$ ) (Tabela 5). SOCS-3 atua como um inibidor da sinalização da leptina em células de mamíferos, e a administração da leptina é capaz de aumentar a expressão do RNAm do SOCS-3 no hipotálamo de camundongos *ob/ob* e outros mamíferos (BJØRBAEK et al., 1998; EYCKERMAN et al., 2000).

Tabela 5 - Quantificação da expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore

| Gene  | Alvo<br>Precoce | Alvo<br>Tardio | RPL19<br>Precoce | RPL19<br>Tardio | Razão | E.P.M. | $\Delta\Delta CT$ | E.P.M. | Valor-<br><i>P</i> |
|-------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|-------|--------|-------------------|--------|--------------------|
| SOCS3 | 32,4            | 34,5           | 19,1             | 22,1            | 0,55  | 0,50   | 0,85              | 3,14   | 0,81               |
| NPY   | 25,2            | 28,8           | 19,1             | 22,1            | 1,60  | 5,27   | -0,68             | -2,23  | 0,77               |
| NPYY1 | 27,3            | 27,2           | 19,1             | 22,1            | 0,12  | 0,06   | -3,14             | 1,73   | 0,11               |
| NPYY4 | 26,7            | 25,9           | 19,1             | 22,1            | 0,07  | 0,04   | -3,77             | 1,91   | 0,08               |

Razão =  $\Delta CT_{precoce} / \Delta CT_{n\tilde{a}o\ precece}$

EPM = Erro padrão da média

$\Delta\Delta CT = -\Delta Ct_{RPL19} - \Delta Ct_{interesse}$

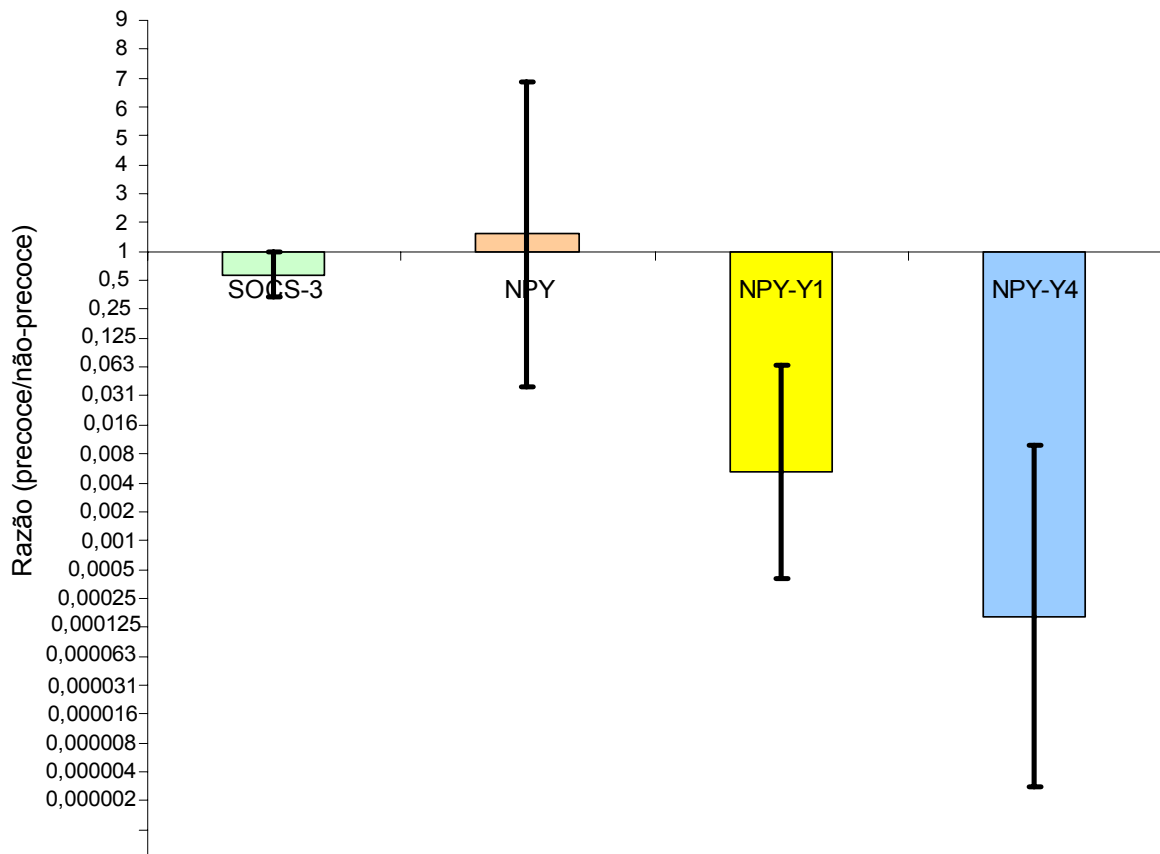


Figura 9 – Razão da expressão gênica para os genes SOCS-3, NPY, NPY-Y1 e NPY-Y4 entre as novilhas precoces e não precoces

Acredita-se que existe um mecanismo “feedback”, pelo qual um aumento da leptina induz a expressão do SOCS-3 e inibe diretamente a sinalização do receptor, o qual seria responsável pela criação da resistência da leptina (BJØRBAEK et al., 1998). Pensava-se que animais bem nutridos poderiam ser resistentes a leptina devido a um aumento na expressão do SOCS-3 no hipotálamo e adenohipófise, contudo o jejum aumentou e não diminuiu a expressão do RNAm do SOCS-3 na adenohipófise de vacas (AMSTALDEN et al., 2005). Bjorbaek et al. (1998) demonstraram que a indução do SOCS-3 ocorre rapidamente, após a administração periférica de leptina, em regiões do hipotálamo que parecem estar envolvidas na regulação do peso corpóreo, e que SOCS-3 é um regulador negativo da transdução do sinal da leptina. Estes resultados sugerem que a expressão do SOCS-3 não está relacionada ao controle do eixo reprodutivo em gado, não havendo efeito de tratamento na expressão do SOCS-3 pelo hipotálamo.

Neurônios do núcleo arqueado expressam o NPY, um dos mais abundantes peptídeos no hipotálamo (FRIEDMAN; HALAAS, 1998; WILLIAMS et al., 2000). As várias funções do NPY são mediadas pela família de receptores (Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6) (GEHLERT, 1999). A sinalização do NPY no hipotálamo demonstra regular os efeitos da leptina na atividade reprodutiva em roedores e primatas (AUBERT et al., 1998; SAINSBURY et al., 2002). Em ratos *ob/ob*, a ausência da inibição de leptina conduz a um aumento crônico na expressão de NPY pelo hipotálamo, e o tratamento com leptina reduz o NPY e restabelece a fertilidade (SAINSBURY et al., 2002). Ainda quando administrado centralmente, o NPY inibe a função sexual em roedores (PIERROZ et al., 1996). Baseado nestes resultados é plausível a hipótese que alterações na sinalização do NPY no hipotálamo poderia ser responsável pela maturidade sexual em novilhas.

Pode-se notar que, de acordo com o resultado deste estudo, a expressão do NPY no hipotálamo não foi diferente estatisticamente entre os grupos das novilhas (precoce e não precoce) ( $P > 0,70$ ; Tabela 5). Contudo, houve uma tendência na expressão do NPY-Y1 e NPY-Y4 de estar reduzida em novilhas que atingiram a puberdade precocemente ( $P = 0,10$ , Tabela 5). A expressão de NPY-Y1 foi de 8.3 vezes menor e a expressão do NPY-Y4 foi 14.3 vezes menor em novilhas que atingiram a puberdade precocemente (Figura 9). Quando analisados em conjunto, houve uma redução de 11 vezes na expressão dos receptores de NPY em novilhas sexualmente precoces e este efeito foi significativo estatisticamente ( $P = 0,03$ , Tabela 5). A média da razão entre eles foi de 0,09 indicando uma tendência significativa entre as novilhas precoces e as não precoces sexualmente.

A importância da sinalização do NPY-Y1 para a maturidade prolongada do hipotálamo pré-púbere tem sido demonstrada em modelos de camundongos *knockout*  $Y1^{-/-}$  (interrupção do gene). Em animais com deficiência no receptor Y1 têm sido relatado um aumento nos níveis de hormônio luteinizante e no tamanho da vesícula seminal após 48 horas de jejum (PEDRAZZINI et al., 1998). Injeções diárias de leptina em ratas jovens  $Y1^{-/-}$  causaram um avanço na puberdade comparado a ratas normais (*wild-type*), o que é acompanhado pelo aumento no peso do útero. Uma melhora na regularidade no eixo gonadotrópico foi também verificada em camundongos *ob/ob* mutantes *knockout*  $Y1^{-/-}$ , sugerindo que a função permissiva da leptina em relação á puberdade é provavelmente mediada por NPY e pela sinalização do NPY-Y1 (PRALONG et al., 2002). A remoção do receptor Y4 em

camundongos *ob/ob* também restaura em 100% a fertilidade em camundongos machos e melhora em 50% a fertilidade em camundongos fêmeas *knockout* (SAINSBURY et al., 2002).

Pralong et al. (2000) demonstraram o envolvimento do subtipo Y1 dos receptores de NPY na mediação do NPY no eixo gonadotrópico. Além disto, eles sugerem a existência de uma inibição tônica causada pelo NPY hipotalâmico endógeno na atividade do eixo gonadotrópico em fêmeas pré-púberes de camundongos. Esta segunda descoberta é inteiramente consistente com a hipótese de que o NPY participa no funcionamento da puberdade.

O subtipo NPY-Y1 parece modular as ações da leptina em situações de alta expressão hipotalâmica do NPY. Contudo, os caminhos independentes de leptina envolvendo Y1 também existem para controlar a alimentação e a atividade do eixo reprodutivo, porque um efeito da mutação do Y1 pode ser observado em camundongos *ob/ob*. Estes resultados sugerem fortemente a existência de pelo menos dois diferentes tipos de caminhos mediados pelo NPY-Y1 para o controle da alimentação e reprodução. Alguns destes caminhos parecem ser modulados pela leptina e os outros parecem ser independentes da leptina (COWLEY et al., 2001).

Estes resultados propõem que devido à baixa expressão dos receptores NPY, os hipotálamos de novilhas atingindo a puberdade mais precocemente podem ser menos sensíveis à inibição do NPY, e então atingem a puberdade com níveis mais baixos de leptina circulante. Assim, existem dois caminhos detectados que poderiam ser responsáveis pela rápida puberdade nestas novilhas: uma alta expressão de leptina no tecido adiposo, e uma menor expressão dos receptores do NPY no hipotálamo.

## 7 CONCLUSÕES

- Não houve correlação entre a expressão do gene NPY e SOCS-3 e a precocidade sexual das novilhas Nelore.
- Houve uma tendência significativa de redução da expressão dos receptores de NPY-Y1 e NPY- Y4 ( $P = 0,10$ ) no hipotálamo das novilhas precoces.

## REFERÊNCIAS

ACNB - ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL. **Histórico da Raça Nelore**. (Eletronic Publication). Disponível em: <http://www.nelore.org.br/default3.asp>>. Acesso em: 30 nov. 2006.

AL-BADER, M. D.; AL-SARRAF, H. A. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. **Developmental Brain Research**, v. 156, n. 1, p. 38– 45, 2005.

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.

AMSTALDEN, M.; SPENCER, T. E.; HARMS, P. G.; WILLIAMS, G. L. Expression of leptin receptor and suppressor of cytokine signaling-3 genes in adenohypophysis of normal-fed and fasted cows. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 2, p. 237-245, 2005.

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

BANKS, A. S.; DAVIS, S. M.; BATES, S. H.; MYERS JR., M. G. Activation of Downstream Signals by the Long Form of the Leptin Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14563–14572, 2000.

BARB, C. R. The Brain-Pituitary-Adipocyte Axis: Role of Leptin in Modulating Neuroendocrine Function. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1249-1257, 1999.

BARD, J. A.; WALKER, M. W.; BRANCHEK, T. A.; WEINSHANK, R. L. Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y, and peptide YY. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 10, p. 26762–26765, 1995.

BAUMANN, H.; MORELLA, K. K.; WHITE, D. W.; DEMBSKI, M.; BAILON, P. S.; KIM, H.; LAI, C. F.; TARTAGLIA, L. A. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. **Proceedings of National**



**Academy of Sciences of the United States of America**, n. 16, v. 93, p. 8374–8378, 1996.

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

BJØRBÆK, C.; EL-HASCHIMI, K.; FRANTZ, J. D.; FLIER, J. S. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 30059-30065, 1999.

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.

BOLAND, M.P., LONERGAN, P., O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, oocyte and embryo development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1323-1340, 2001.

CAMPBELL, R. E.; SMITH, M. S.; ALLEN, S. E.; GRAYSON, B. E.; FFRENCH-MULLEN, J. M.; GROVE, K. L. Orexin neurons express a functional pancreatic polypeptide Y4 receptor. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 4. p. 1487–1497, 2003.

CHAN, Y. L.; LIN, A.; MCNALLY, J.; PELEG, D.; MEYUHAS, O.; WOOL, I. G. The primary structure of rat ribosomal protein L19. A determination from the sequence of nucleotides in a cDNA and from the sequence of amino acids in the protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 3, p. 1111–1115, 1987.

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

COWLEY, M. A.; SMART, J. L.; RUBINSTEIN, M.; CERDAN, M. G.; DIANO, S.; HORVATH, T. L.; CONE, R. D.; LOW, M. J. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, v. 411, p. 480-484, 2001.

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

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

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.

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

EYCKERMAN, S.; BROEKAERT, D.; VERHEE, A.; VANDEKERCKHOVE, TAVERNIER, J. Identification of the Y985 and Y1077 motifs as SOCS3 recruitment sites in the murine leptin receptor. **FEBS Letters**, v. 486, n. 1, p. 33-37, 2000.

FETISSOV, S. O.; KOPP, J.; HOKFELT, T.; Distribution of NPY receptors in hypothalamus. **Neuropeptides**, v. 38, n. 4, p. 175-188, 2004.

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

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

FOSTER, D. L. Puberty in the sheep. In : KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.) **The physiology of reproduction**, 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 411-451.

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, p. 2158-2167, 2002.

GARVERICK, H. A.; SMITH, M. Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 9, p. 223-246, 1993.

GEHLERT, D. R. Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. **Neuropeptides**, v. 33, n. 5, p. 329-338, 1999.

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

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

KINDER, J. E.; DAY, M. L.; KITTOK, R. J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**, v. 34, p. 167-186, 1987.

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

KREBS, D. L.; HILTON, D. J. SOCS Proteins: Negative Regulators of Cytokine Signaling. **Stem Cells**, v. 19; p. 378-387, 2001.

LARSEN, P. J.; KRISTENSEN, P. Central Y4 receptor distribution. Radioactive ribonucleotide probe in situ hybridization with in vitro receptor autoradiography. **Methods in Molecular Biology**, v. 153, p. 185-198, 2000.

LEUPEN, S. M.; BESECKE, L. M.; LEVINE, J. E. Neuropeptide Y Y1-receptor stimulation is required for physiological amplification of preovulatory luteinizing hormone surges. **Endocrinology**, v. 138, n. 7, p. 2735–2739, 1997.

LUNDBERG, J. M.; TATEMOTO, K. Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 116, n. 4, p. 393–402, 1982.

LUNDELL, I.; BLOMQUIST, A. G.; BERGLUND, M. M.; SCHOBER, D. A.; JOHNSON, D.; STATNICK, M. A.; GADSKI, R. A.; GEHLERT, D. R.; LARHAMMAR, D. Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 49, p. 29123–29128, 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, 2004.

MARSON, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; MIRANDA NETO, T. Puberdade e maturidade sexual em novilhas de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 1, p. 3-12, 2004.

MASUHARA, M.; SAKAMOTO, H.; MATSUMOTO, A.; SUZUKI, R.; YASUKAWA, H.; MITSUI, K.; WAKIOKA, T.; TANIMURA, S.; SASAKI, A.; MISAWA, H.; YOKOUCHI, M.; OHTSUBO, M.; YOSHIMURA, A. Cloning and Characterization of Novel CIS Family Genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 239, n. 2, p. 439-446, 1997.

MATSUDA, H.; BRUMOVSKY, P. R.; KOPP, J.; PEDRAZZINI, T.; HOKFELT, T.; Distribution of neuropeptide Y Y1 receptors in rodent peripheral tissues. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 449, n. 4, p. 390–404, 2002.

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

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.

MUNZBERG, H.; MYERS JR., M. G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nature Neuroscience**, v. 8, p. 566-570, 2005.

NAGATANI, S.; GUTHIKONDA, P.; THOMPSON, R.C.; TSUKAMURA, H.; MAEDA K. I.; FOSTER, D. L. Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. **Neuroendocrinology**, v. 67, n. 6, p. 370–376, 1998.

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 America *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 361-372, 2004.

OLIVEIRA, C. M. G.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GAMBARINI, M. L.; 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.

PARKER, R. M.; HERZOG, H. Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 1431–1448, 1999.

PATTERSON, D. J.; PERRY, R. C.; KIRACOFÉ, G. H. Management considerations in heifer development and puberty. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 4018-4035, 1992.

PEDRAZZINI, T.; SEYDOUX, J.; KUNSTNER, P.; AUBERT, J. F.; GROUZMANN, E.; BEERMANN, F.; BRUNNER, H. R. Cardiovascular response, feeding behavior, and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. **Nature Medicine**, v. 4, n. 6, p. 722-726, 1998.

PEDRAZZINI, T. Importance of NPY Y1 receptor-mediated pathways: assessment using NPY Y1 receptor knockouts. **Neuropeptides**, v. 38, n. 4, p. 267–275, 2004.

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

PEREIRA, F. V. **Semiquantificação de RNAm para receptores de gonadotrofinas em folículos de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2003. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PERON, N.; FERNANDEZ, Y. O. Influencia del nivel alimentario bajo-moderado en los valores de progesterona sanguínea en novillas  $\frac{3}{4}$  Holstein X  $\frac{1}{4}$  Cebú. **Revista Cubana de Reproducción Animal**, v. 12, n. 1, p. 81-91, 1995.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PIERROZ, D. D.; CATZEFLIS, C.; AEBI, A. C.; RIVIER, J. E.; AUBERT, M. L. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 3-12, 1996.

PRALONG, F. P.; VOIROL, M. J.; GIACOMINI, M.; GAILLARD, R. C.; GROUZMANN, E. Acceleration of pubertal development following central blockade of the Y1 subtype of neuropeptide Y receptors. **Regulatory Peptides**, n. 95, v. 1-3, p. 47-52, 2000.

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

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, p. 259-270, 2003.

RESTLE, J.; POLLI, V. A.; DE SENNA, D. B. Breed and heterosis effect on age and weight at puberty and reproductive performance of beef heifers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n. 4, v. 34, p. 701-707, 1999.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effects of Stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 523-532, 1991.

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.

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

SANTOS, J. E. P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 26, n. 1, p. 19-89, 1998.

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

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.

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

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

STEPANYAN, Z.; KOCHARYAN, A.; PYRSKI, M.; HÜBSCHLE, T.; WATSON, A. M. D.; SCHULZ, S.; MEYERHOF, W. Leptin-Target Neurones of the Rat Hypothalamus Express Somatostatin Receptors. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, n. 9, p. 822-830, 2003.

SUZUKI, K.; KOBAYASHI, Y.; KATOH R.; KOHN, L. D.; KAWAOI, A. Identification of thyroid transcription factor-1 in C cells and parathyroid cells. **Endocrinology**, v. 139, n. 6, p. 3014-3017, 1998.

TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K. J.; SMUTKO, J. S.; MAYS, G. G.;

WOOLF, E. A.; MONROE, C. A.; TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, p. 1263-1271, 1995.

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

TATEMOTO, K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 18, p. 5485–5489, 1982.

THALLMAN, R. M.; CUNDIFF, L. V.; GREGORY, K. E.; KOCH, R. M. Germplasm evaluation in beef cattle – cycle IV: Postweaning growth and puberty in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 10, p. 2651-2659, 1999.

VAISSE, C.; HALAAS, J. L.; HORVATH, C. M.; DARNELL JR., J. E.; STOFFEL, M.; FRIEDMAN, J. M. Leptin activation of STAT3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. **Nature Genetics**, v. 14, p. 95-97, 1996.

WAHLESTEDT, C.; YANAIHARA, N.; HÅKANSON, R. Evidence for different pre-and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. **Regulatory Peptides**, v. 13, n. 3-4, p. 307–318, 1986.

WILLIAMS, G.; HARROLD, J. A.; CUTLER, D. J. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: Lifting the lid on the black box. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 3. p. 385–396, 2000.

WILLIAMS, G. L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M. R.; STANKO, R. L.; NIZIELSKI, S. E.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 2, p. 339-349, 2002.

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



YOSHIMURA, A.; OHKUBO, T.; KIGUCHI, T.; JENKINS, N. A.; GILBERT, D. J.; COPELAND, N. G.; HARA, T.; MIYAJIMA, A. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. **The Embo Journal**, v. 14, p. 2816-2826, 1995.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART JR., C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 85, p. 1-12, 2006.

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