

POLIMORFISMO DO EXON 20 DO GENE DO RECEPTOR DA LEPTINA E CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LEPTINA EM NOVILHAS NELORE CRIADAS A PASTO

Lucas Jacomini Abud^{1*}; Cátia Oliveira Guimarães Abud²; Maria Clorinda Soares Fioravanti³; Eduardo de Oliveira Melo⁴; Emmanuel Arnhold³; Fernanda Paulini⁵; José Robson Bezerra Sereno⁶

SAP 15112 Data envio: 14/09/2016 Data do aceite: 21/02/2017

Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 16, n. 4, out./dez., p. 443-448, 2017

RESUMO - As modificações fisiológicas que ocorrem na puberdade em novilhas são alvos de estudos para melhor compreender este fenômeno e identificar alternativas para se atingir maior precocidade reprodutiva. Dentre os fatores mais relevantes que influenciam a puberdade pode-se destacar a leptina e o seu receptor, por se tratar de fatores que realizam a comunicação entre o status nutricional e o eixo reprodutivo, sendo que sua participação na fisiologia reprodutiva não está completamente esclarecida. Objetivou-se com este estudo identificar a ocorrência de polimorfismos no exon 20 do receptor da leptina e relacioná-lo com as concentrações séricas de leptina e à ocorrência da puberdade em novilhas Nelore criadas a pasto. Foram acompanhadas 56 novilhas Nelore durante 14 meses no qual se realizou a dosagem de progesterona para a determinação da ocorrência da puberdade, dosagem da leptina e sequenciamento do gene do receptor da leptina para identificação de ocorrência de polimorfismos do tipo SNP. Comparou-se as concentrações de leptina entre os animais que entraram em puberdade com os que não entraram, e posteriormente avaliou-se o hormônio dos animais que entraram em puberdade nos períodos pré-puberal e o puberal. Após a identificação do polimorfismo analisou-se as possíveis interações da ocorrência de mutação no gene do receptor da leptina com as concentrações de leptina e com a ocorrência da puberdade. Após a análise dos dados não foi observada relação da ocorrência da mutação no gene do receptor da leptina T945M com as concentrações plasmáticas de leptina e a ocorrência da puberdade em novilhas criadas a pasto.

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*, bovino de corte, hormônio, idade a puberdade, precocidade sexual, reprodução.

POLYMORPHISM OF EXON 20 OF THE LEPTIN RECEPTOR GENE AND SERUM LEPTIN CONCENTRATIONS OF NELLORE HEIFERS RAISED ON PASTURE

ABSTRACT - The physiological changes that occur at puberty in heifers are objectives of study in order to better understand this phenomenon and to identify alternatives to achieve greater sexual precocity. Among the most important factors that influence puberty the leptin hormone and its receptor can be highlighted, as they are factors that perform communication between the nutritional status and the reproductive axis, and its participation in reproductive physiology is not fully understood. Therefore, the aim of this study was to determine the serum profile of the leptin hormone, to identify polymorphisms at exon 20 of the leptin receptor and associate them with the occurrence of puberty in heifers raised on pasture. We followed 56 heifers for 14 months and carried out the progesterone assay for determining the puberty occurrence, leptin dosage and sequencing of the leptin receptor gene for identifying the occurrence of SNP polymorphisms. Concentration of leptin was compared between the animals puberty with animals not puberty and the hormone of the animals puberty in the pre-pubertal and pubertal periods. After the identification of the polymorphism, the possible interactions of the mutation occurrence in the leptin receptor gene with the leptin concentrations and the puberty were analyzed. After analyzing, no observed correlation between the occurrence of the mutation in the leptin T945M receptor gene and leptin plasma concentrations and the puberty in heifers raised on pasture.

Key words: *Bos taurus indicus*, beef cattle, hormone, age of puberty, sexual precocity, reproduction.

¹Professor da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, UNIFESSPA, campus de Xinguara, Rua Maranhão s/n, Centro, CEP 68.555-251, Xinguara, Pará, Brasil. E-mail: lucas.abud@unifesspa.edu.br. *Autor para correspondência

²Médica Veterinária da UNIFESSPA. E-mail: catia.abud@unifesspa.edu.br

³Professor(a) da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, UFG, campus Samambaia, Av. Esperança s/n, campus Universitário, CEP 74.690-900, Goiânia, Goiás, Brasil. Email: clorinda@ufg.br; emmanuelarnhold@yahoo.com.br

⁴Pesquisador da Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte (final), Caixa Postal 02372, CEP 70.770-917, Brasília, Distrito Federal, Brasil. E-mail: eduardo.melo@embrapa.br

⁵Pós-Doutoranda, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Brasília, UnB, campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70.910-900, Brasília, Distrito Federal, Brasil. E-mail: fepaulini@hotmail.com

⁶Pesquisador da Embrapa Sede, Asa Norte, CEP 70.770-901, Brasília, Distrito Federal, Brasil. E-mail: robson.sereno@embrapa.br

INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro possui grandes diferenças de potencial de produção, o que representa variações de resultados entre as propriedades. Para minimizar essas diferenças e aumentar a capacidade produtiva deve-se intensificar a seleção dos animais para as características de interesse, como rápido desenvolvimento, alto ganho de peso, precocidade de acabamento de carcaça e precocidade sexual. Dentre as características a serem selecionadas, pode-se destacar a idade à puberdade, pois esta possibilita reduzir o tempo em que uma fêmea fica na propriedade sem produzir bezerro, diminuindo o ciclo de produção desses animais (BOLIGON et al., 2008).

A idade à puberdade é determinada pela perda da sensibilidade ao efeito do *feedback* negativo do estradiol, o que resulta no aumento da secreção de hormônios gonadotróficos pelo eixo hipotalâmico-hipofisário e consequente desenvolvimento folicular, com posterior ovulação. Este evento fisiológico é influenciado por diversos fatores genéticos e ambientais, dentre estes pode-se destacar o efeito da nutrição (NOGUEIRA, 2004).

A comunicação entre a condição nutricional e o sistema reprodutor é realizada pela ação do hormônio leptina, pois este influencia na atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (ZIEBA et al., 2004). Este hormônio é codificado pelo gene da leptina e se trata de um peptídeo secretado principalmente pelos adipócitos, com ação na regulação do peso corporal e na ingestão de alimentos (PELLEYMOUNTER et al., 1995). 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, baixas concentrações de leptina atuam como uma “chave metabólica” a fim de inibir a atividade reprodutiva.

Além da atuação endócrino fisiológica da reprodução como sinalizador da condição nutricional do animal, também é descrito a interação hormonal da leptina com o início da puberdade (ZIEBA et al., 2004), em que é observado o aumento das concentrações deste hormônio durante o desenvolvimento puberal (HAUSMAN et al., 2012). Estudos em bovinos demonstram que a concentração da leptina circulante e a expressão gênica são afetadas na fase de pré-puberdade (AMSTALDEN et al., 2000), indicando uma relação das concentrações desse peptídeo e a expressão do seu gene com a ocorrência da puberdade (GARCIA et al., 2002).

Os receptores do hormônio leptina desempenham função primordial para desencadear estímulos celulares na presença do hormônio específico, caso estes receptores apresentem alguma alteração, o animal pode manifestar alteração da função fisiológica. A identificação de polimorfismos associados ao gene do receptor da leptina torna-se importante, pois, ao estudar a dinâmica hormonal, deve-se ater às possíveis consequências dessas modificações (KOMISAREK; DORYNEK, 2006). Dentre estas, pode-se destacar uma possível interação com a

ocorrência da puberdade, que possa proporcionar melhoria do índice reprodutivo (SU et al., 2012).

As modificações nos genes, quando associadas a melhor índice produtivo, podem ser utilizadas como marcadores moleculares. Estes marcadores são ferramentas importantes no processo de melhoramento genético animal, por permitir a identificação precoce de animais com genes associados às características de interesse zootécnico (PFEIFER et al., 2008).

O objetivo deste estudo foi identificar a ocorrência de polimorfismos no exon 20 do receptor da leptina e relacioná-lo com as concentrações séricas de leptina e a ocorrência da puberdade em novilhas Nelore criadas a pasto.

MATERIAL E MÉTODOS

As novilhas foram criadas na área experimental da Embrapa Cerrados. O clima na região é caracterizado como tropical-quente-subúmido com duas estações definidas: uma seca (maio a setembro) e outra chuvosa (outubro a abril) (Embrapa Cerrados - CPAC: www.agritempo.gov.br/agroclima/sumario). Acompanhou-se 56 novilhas da raça Nelore, com idade média de $16,57 \pm 2,52$ meses e peso médio de $227,11 \pm 34,32$ kg, durante um período de 14 meses (fevereiro de 2008 a abril de 2009). Os animais foram mantidos sob pastejo extensivo, em pastagens cultivadas de *Brachiaria decumbens*, com taxa de lotação de 1 UA ha⁻¹, com sal mineralizado oferecido *ad libitum* em cochos cobertos. Realizou-se o manejo sanitário (desverminação e vacinação) de acordo com o calendário profilático da região do Distrito Federal.

Dois touros com avaliação andrológica comprovada foram introduzidos no rebanho. Utilizou-se a gestação como condição determinante para finalização das colheitas de sangue, sendo o diagnóstico de gestação realizado com auxílio de um aparelho de ultrassonografia (Aloca® 7,5 mHz).

Durante o período experimental de 14 meses e em meses intervalares, realizou-se, na primeira semana de cada período, a pesagem e o exame de ultrassonografia para detecção de gestação, totalizando sete colheitas de cada parâmetro. No período de avaliação colheu-se sangue para dosagem de leptina e progesterona, sendo o último, avaliado com a finalidade de se determinar a ocorrência da puberdade. Estas últimas colheitas ocorreram em intervalos de sete dias, perfazendo quatro colheitas em cada período de amostragem.

O sangue foi colhido por venopunção da jugular em tubos de ensaio com vácuo, contendo heparina (Vacuntainer®). Centrifugou-se as amostras sanguíneas em temperatura ambiente a 4695 x g por 10 min, para a obtenção de plasma e estocou-se a -20 °C para posterior avaliação hormonal. Na primeira colheita do experimento, obteve-se amostras de sangue para extração de DNA, em tubos a vácuo contendo EDTA (Vacuntainer®), para o sequenciamento do gene do receptor da leptina.

O plasma obtido a partir dos tubos heparinizados, foi utilizado para quantificação da progesterona e da

leptina, pela técnica de radioimunoensaio (RIA), com a utilização de reagentes comerciais (Coat-A-Count®, DPC, Los Angeles, CA e Millipore®, Missouri, USA, respectivamente). Dosou-se o hormônio leptina seguindo a metodologia descrita por Beltran e Nogueira (2010), sendo as avaliações hormonais realizadas no Laboratório de Endocrinologia da Unesp Araçatuba, SP.

Considerou-se as novilhas como púberes os animais que obtiveram concentrações de progesterona superior a 1 ng mL⁻¹, conforme Perry et al. (1991). Para rastrear o período em que as novilhas estavam púberes utilizou-se como referência o mês do diagnóstico de gestação. Sendo assim, todas as amostras dos períodos anteriores ao mês de diagnóstico de gestação foram analisadas até a determinação da fase impúbere, sendo esta, considerada quando se obteve concentrações de progesterona inferiores a 1 ng mL⁻¹ nas quatro avaliações do mês de amostragem. Os que não ficaram gestantes dosou-se todas as amostras obtidas no experimento.

Para o hormônio leptina, primeiramente avaliou-se as amostras comparando os animais que entraram em puberdade com os que não entraram, dosando-se uma amostra sanguínea de cada animal em cada período experimental, totalizando sete períodos. Posteriormente, avaliaram-se as amostras dos animais que entraram em puberdade, sendo dosadas todas as alíquotas de dois períodos, o pré-puberal e o puberal, totalizando quatro amostras por período.

Para extração do DNA utilizou-se a metodologia descrita por Liefers et al. (2004), amplificando-se por PCR o DNA do exon 20 do gene *LepR* das amostras de cada animal, utilizando-se os primers (Forward: 5'-CAAACAGAAATCAATAC-3' e Reverse: 5'-TTAAACAGTTAGGTCAC-3'), sendo os amplicons submetidos à eletroforese em gel de agarose e recortados do gel para serem purificados, utilizando o reagente comercial Wizard SV (Promega). Os amplicons purificados foram quantificados por espectrofotômetro (NanoDrop) e enviados à plataforma de sequenciamento de DNA da Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia. Alinhou-se as sequências resultantes contra as sequências do gene *LepR* depositadas no GenBank da espécie *Bos taurus* (AJ580801), utilizando o programa DNAMAN (Lynnon Corporation).

Após as dosagens hormonais e sequenciamento do DNA, analisou-se as possíveis interações da ocorrência de mutação no gene do receptor da leptina com as concentrações de leptina, comparando-se todas as avaliações hormonais dos animais que apresentaram mutação com os que não apresentaram. Para avaliar a possível interação da concentração do hormônio leptina e ocorrência da mutação com a puberdade, separou-se as novilhas em quatro grupos: animais púberes sem mutação, animais púberes com mutação, animais não púberes sem mutação e animais não púberes com mutação. Assim sendo, para realizar as avaliações, utilizou-se para comparação todas as amostras hormonais obtidas.

Utilizou-se o teste T para realizar a comparação das concentrações hormonais de leptina entre os grupos de animais não púberes e púberes e entre os animais com a

ocorrência de mutação e o sem a ocorrência de mutação, sendo no último, utilizada todas as dosagens de leptina obtidas. Já para a análise de frequência da ocorrência da mutação entre os animais púberes e não púberes realizou-se o teste Exato de Fisher. Para comparar as concentrações de leptina das fases pré-puberal e puberal e dos animais púberes sem mutação, animais púberes com mutação, animais não púberes sem mutação e animais não púberes com mutação utilizou-se análise de variância, sendo as diferenças das médias confrontadas pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa BioEstat 5.0, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O intervalo de idade à puberdade das novilhas neste estudo variou de 26,75 ± 2,91 a 28,70 ± 2,73 meses e peso entre 303,36 ± 24,88 a 328,92 ± 32,47 kg, o que está dentro dos valores descritos por Nogueira (2004) para a raça. Segundo este autor, a idade média brasileira para a primeira concepção em bovinos Nelore é de 31 meses, podendo ter variações de 16 a 40 meses. Estas variações estão relacionadas às condições ambientais e a variabilidade genética dos rebanhos (NOGUEIRA, 2004; BOLIGON et al., 2011).

A elevada idade à puberdade neste experimento pode ser resultante da estratégia de seleção adotada na propriedade, pois a mesma, busca animais com elevado peso em idade adulta, que tem como consequência o aumento do porte dos animais e o atraso na ocorrência da puberdade das fêmeas, corroborando com Pacheco et al. (2008), os quais afirmam que a seleção de animais de grande porte pode significar a obtenção de rebanhos tardios e exigentes em termos nutricionais, sendo estes contrários à pecuária de ciclo rápido.

Para evitar novilhas tardias, como observado neste experimento, deve-se buscar a seleção para o rápido desenvolvimento em idades jovens e início precoce da atividade reprodutiva. Baldi et al. (2008) afirmaram que animais mais desenvolvidos em idades jovens entrem em reprodução mais cedo, determinando menor idade ao primeiro parto. Esta afirmação pode ser justificada devido ao amadurecimento precoce do eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal, que desencadeia a atividade cíclica das fêmeas. Além da seleção, pode-se utilizar terapias hormonais (CABRAL et al., 2013), exposição ao touro em idades jovens (MENEZES et al., 2010) e alteração do manejo nutricional para que proporcionem maior disponibilidade de nutrientes ao animal em desenvolvimento (VAZ et al., 2012). Estes manejos visam estimular o desenvolvimento dos animais e proporcionar a ativação do eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal, antecipando o início da atividade reprodutiva.

O peso das novilhas à puberdade verificado nesse trabalho representa o intervalo de 66 a 72% do peso adulto, considerando o peso médio de 456 kg das fêmeas adultas do rebanho trabalhado. Verifica-se que este valor está abaixo do encontrado por Freneau et al. (2008), com valor de 85% do rebanho avaliado (450 kg). Essa variação de resultado pode ser justificada pelo manejo alimentar adotado e variação genética de cada rebanho. Propriedades

que trabalham com manejo nutricional que proporciona maior desenvolvimento inicial ou com a seleção para precocidade sexual, antecipam a ocorrência da puberdade.

Em relação às concentrações séricas de leptina, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores encontrados para o grupo de novilhas não púberes e púberes (Tabela 1). A não alteração das concentrações de leptina pode ser justificada pela baixa qualidade da dieta no período de seca. Segundo Paula et al. (2010) e

Mesacasa et al. (2012), animais criados a pasto estão expostos à dietas de baixa qualidade no período de seca, devido ao amadurecimento da forragem, e esta condição ambiental reduz a taxa de crescimento dos animais. Para serem observadas modificações nas concentrações de leptina sérica são necessárias grandes alterações no peso corporal dos animais, para que ocorra uma maior formação de tecido adiposo e aumento da produção deste hormônio (GARCIA et al., 2002).

TABELA 1. Média e desvio padrão das concentrações séricas de leptina (ng mL^{-1}) nos períodos de colheitas entre as novilhas Nelore não púberes e púberes criadas a pasto.

		1° Período	2° Período	3° Período	4° Período	5° Período	6° Período	7° Período	Média Geral
Não púberes	Média	2,31 a	2,40 a	2,39 a	2,40 a	2,36 a	2,51 a	2,44 a	2,34
	Desvio Padrão	0,12	0,22	0,23	0,23	0,23	0,21	0,19	0,24
Púberes	Média	2,42 a	2,42 a	2,31 a	2,27 a	2,28 a	2,42 a	2,51 a	2,36
	Desvio Padrão	0,33	0,25	0,17	0,15	0,17	0,18	0,28	0,23

Letras diferentes na mesma coluna indica diferença significativa ($p < 0,05$) utilizando o teste T.

Os ganhos de peso diário dos animais foram de $0,35 \pm 0,03$ kg e $0,47 \pm 0,15$ kg, para o grupo das novilhas que não entraram em puberdade e para as que entraram, respectivamente, havendo diferença entre os mesmos ($p < 0,05$). O maior desenvolvimento do grupo de novilhas púberes justifica a manifestação da puberdade, pois, segundo Vaz et al. (2012), o rápido desenvolvimento corporal possibilita a manifestação precoce da puberdade. Porém, este desenvolvimento não foi suficiente para alterar a deposição de gordura corporal e, conseqüentemente, modificar as concentrações de leptina, uma vez que estes animais estavam em desenvolvimento e na escala de crescimento, primeiro deposita-se massa muscular para, depois, depositar tecido adiposo, conforme descrito por Souza et al. (2012).

Os valores médios das concentrações de leptina dos grupos não púberes e púberes estão próximos ao descrito por Zieba et al. (2004) para novilhas submetidas a baixa disponibilidade de alimentação ($2,0 \text{ ng mL}^{-1}$). Isto ocorreu porque os animais deste estudo estavam submetidos ao manejo extensivo de pastagem, sendo que estas fêmeas passaram por um período de estação seca com forragem de baixa qualidade, fator este que contribuiu para as baixas concentrações de leptina. Segundo Donato Junior et al. (2011) e Israel et al. (2012), a redução da leptina sérica contribui para o atraso na ocorrência da puberdade. Fator este que pode ter contribuído com a elevada idade à puberdade neste trabalho.

Não foi observado aumento das concentrações de leptina com a aproximação da puberdade ($p > 0,05$) (Tabela 2). Resultados contrários foram descritos por Garcia et al. (2002), que observaram o aumento de leptina sérica com a aproximação da puberdade de $3,8 \pm 0,4 \text{ ng mL}^{-1}$ para $6,4 \pm 0,4 \text{ ng mL}^{-1}$, fato também descrito por Amstalden et al. (2000), trabalhando com novilhas na fase peripuberal, os quais verificaram elevação nas concentrações séricas de leptina de $1,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$. Nestes estudos, os animais estavam submetidos à

dietas que proporcionavam crescimento contínuo, com ganho esperado de $0,68$ kg (AMSTALDEN et al., 2000; GARCIA et al., 2002), diferentemente do presente trabalho, no qual as novilhas tiveram ganho de peso de $0,47 \pm 0,15$ kg devido às influências ambientais sofridas, uma vez que foram criadas a pasto. Este manejo resultou na alteração da qualidade da dieta no decorrer do experimento e, conseqüentemente, a não modificação das concentrações de leptina com a aproximação da puberdade. Esta observação sugere que este hormônio não é fator determinante para a ocorrência deste evento fisiológico. A manifestação da puberdade é decorrente de vários fatores ambientais e genéticos, que podem influenciar no padrão de secreção dos hormônios gonadotróficos e, conseqüentemente, na ocorrência da puberdade (VAZ et al., 2012; CABRAL et al., 2013).

Ao avaliar os sequenciamentos do gene do receptor da leptina foi observada a ocorrência da mutação na posição T945M do gene, a qual provoca uma mudança de aminoácido na proteína LepR (C115T). Esse mesmo polimorfismo também foi descrito em vacas das raças Holandês (LIEFERS et al., 2004), Aberdeen Angus, Brangus Ibagé e Charolês (ALMEIDA et al., 2008), Slovak Spotted (TRAKOVICKÁ et al., 2011) e Nelore (NASCIMENTO et al., 2012). Ao estudar-se a distribuição da mutação, não se encontrou diferença ($p > 0,05$) entre os grupos não púberes e púberes (Tabela 3).

Dos animais estudados, 19,64% (11 animais) apresentaram o polimorfismo C115T, alterando o aminoácido treonina para metionina e 80,35% (45 animais) não apresentaram esse polimorfismo (CC). Neste estudo não foi observado o alelo homozigoto (TT). A frequência dos alelos está próxima aos valores descritos por Silva et al. (2012) e Nascimento et al. (2012) na raça Nelore, sendo que os valores referidos por estes autores, respectivamente, alelo CC 77,3 e 72,7%, alelo CT 21,3 e 26,6% e alelo TT 1,4 e 0,7%. As pequenas variações dos estudos citados em

comparação ao presente trabalho podem ser resultantes do número de animais avaliados.

TABELA 2. Média e desvio padrão das concentrações séricas de leptina (ng mL^{-1}) nas fases pré-puberal e puberal das novilhas Nelore púberes criadas a pasto.

		1º semana	2º semana	3º semana	4º semana
Não púberes	Média	2,05 a	2,09 a	2,16 a	2,09 a
	Desvio Padrão	0,24	0,23	0,26	0,24
Púberes	Média	2,09 a	2,13 a	2,11 a	2,13 a
	Desvio Padrão	0,22	0,19	0,20	0,18

Letras diferentes na mesma coluna indica diferença significativa ($p < 0,05$) utilizando o teste de Tukey.

TABELA 3. Distribuição da ocorrência da mutação do exon 20 do gene do receptor da leptina na posição T945M e concentração de leptina (ng mL^{-1}) entre as novilhas Nelore não púberes e púberes criadas a pasto.

	Ocorrência do polimorfismo	Número de animais	Porcentagem de animais (%)	Concentração de leptina
Novilhas não púberes	Presente	3 a	5,36	$2,20 \pm 0,20$ A
	Ausente	16 a	28,57	$2,13 \pm 0,17$ A
Novilhas púberes	Presente	8 a	14,29	$2,16 \pm 0,33$ A
	Ausente	29 a	51,79	$2,09 \pm 0,18$ A

Letras diferentes na mesma coluna indica diferença significativa ($p < 0,05$) utilizando o teste Exato de Fisher (a) e o teste de Tukey (A).

Ao comparar-se as concentrações de leptina das novilhas que não apresentaram mutação ($2,11 \pm 0,18 \text{ ng mL}^{-1}$) com as que apresentaram tal característica ($2,17 \pm 0,30 \text{ ng mL}^{-1}$), não foi verificada diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Nos grupos de animais não púberes e púberes, com e sem mutação (Tabela 3), não houve diferença na distribuição dos animais com a mutação e nas concentrações de leptina, resultado que sugere que a mutação não possui influência nas concentrações do hormônio leptina e nas características reprodutivas como idade à puberdade. A relação entre este polimorfismo e as concentrações de leptina já foi descrita (LIEFERS et al., 2004), sendo esta associação encontrada em animais gestantes, em que os animais do genótipo CC apresentaram as maiores concentrações. Segundo estes autores, essa alteração implica em ineficiência na transdução do sinal químico por uma isoforma curta com capacidade transdutora menor, comprometendo a função hormonal da leptina.

Nascimento et al. (2012), trabalhando com novilhas Nelore, obtiveram resultados semelhantes ao deste experimento. Os mesmos observaram a ocorrência da mutação T945M e não a relacionaram com a precocidade sexual. Estes autores relatam que o polimorfismo encontrado pode não ter influência sobre a característica reprodutiva de idade ao primeiro parto.

Patterson et al. (2012) descreveram a necessidade de maior compreensão do receptor da leptina com o metabolismo energético e o eixo reprodutivo, pois, em longo prazo, este receptor pode tornar-se um marcador molecular para características reprodutivas. Além da associação de polimorfismos no receptor da leptina com a ocorrência da puberdade, deve-se observar a relação deste gene com outras características reprodutivas, uma vez que,

Wang et al. (2011) descreveram a ocorrência de polimorfismo no gene do receptor da leptina com o número de crias por parto em cabras. Portanto, são necessários mais estudos para melhor compreender a relação entre o polimorfismo T945M com as ações do hormônio leptina e as características reprodutivas.

CONCLUSÕES

No presente estudo não foi observada relação da ocorrência da mutação no gene do receptor da leptina T945M com as concentrações plasmáticas de leptina e a ocorrência da puberdade em novilhas criadas a pasto.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S.E.M.; SANTOS, L.B.S.; PASSOS, D.T.; CORBELLINI, Â.O.; LOPES, B.M.T.; KIRST, C.; TERRA, G.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; MORAES, J.C.F.; WEIMER, T. A. Genetic polymorphisms at leptin receptor gene in three beef cattle breeds. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.31, n.3, p.680-685, 2008.
- AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; WILLIAMS, R.L.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin like-growth factor I. *Biology of Reproduction*, Madison, v.63, n.1, p.127-33, 2000.
- BALDI, F.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R.; BARBOSA, R.T. Parâmetros genéticos para características de tamanho e condição corporal, eficiência reprodutiva e longevidade em fêmeas da raça Canchim. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.37, n.2, p.247-253, 2008.

- BELTRAN, M.P.; NOGUEIRA, G.P. Validação de radioimunoensaio para quantificação de leptina plasmática bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.47, n.1, p.5-12, 2010.
- BOLIGON, A.A.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic parameters and relationships of heifer pregnancy and age at first calving with weight gain, yearling and mature weight in Nelore cattle. **Livestock Science**, Amsterdam, v.141, n.1, p.12-16, 2011.
- BOLIGON, A.A.; VOZZI, P.A.; NOMEINI, J.; RORATO, P.R.N.; BEZERRA, L.A.F.; LÔBO, R.B. Parâmetros genéticos para idade ao primeiro parto estimados por diferentes modelos para rebanhos da raça Nelore. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.432-436, 2008.
- CABRAL, J.F.; LEÃO, K.M.; SILVA, M.A.P.; BRASIL, R.B. Indução do estro em novilhas Nelore com implante intravaginal de progesterona de quarto uso. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v.20, n.1, p.49-53, 2013.
- CUNNINGHAM, M.J.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biology of Reproduction**, Madison, v.60, n.2, p.216-222, 1999.
- DONATO JUNIOR, J.; CRAVO, R.M.; FRAZÃO, R.; ELIAS, C.F. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. **Neuroendocrinology**, Basel, v.93, n.1, p.9-18, 2011.
- FRENEAU, G.E.; SILVA, J.C.C.; BORJAS, A.L.R.; AMORIM, C. Estudo de medidas corporais, peso vivo e condição corporal de fêmeas de raças Nelore *Bos taurus indicus* ao longo de doze meses. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.9, n.1, p.76-85, 2008.
- 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**, Savoy, v.80, n.8, p.2158-2167, 2002.
- HAUSMAN, G.J.; BARB, C.R.; LENTS, C.A. Leptin and reproductive function. **Biochimie**, Paris, v.94, n.10, p.2075-2081, 2012.
- ISRAEL, D.D.; SHEFFER-BABILA, S.; LUCA, C.; JO, Y.; LIU, S.M.; XIA, Q.; SEERGEL, D.J.; DUN, S.L.; DUN, N.J.; CHUA JR, S.C. Effect of leptin and melanocortin signaling interactions on pubertal development and reproduction. **Endocrinology**, Baltimore, v.153, n.5, p.2408-2419, 2012.
- KOMISAREK, J.; DORYNEK, Z. The relationship between the T945M single nucleotide polymorphism in the leptin receptor gene (LEPR) and milk production traits in Jersey cows. **Animal Science**, Penicuik, v.24, n.4, p.271-277, 2006.
- LIEFERS, S.C.; VEERKAMP, R.F.; TE PAS, M.F.W.; DELAVAUD, C.; CHILLIARD, Y.; VAN DER LENDE, T. A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. **Animal Genetics**, Oxford, v.35, n.2, p.138-141, 2004.
- MENEZES, L.M.; BRAUNER, C.C.; PIMENTEL, M.A. Efeitos da bioestimulação sobre a performance reprodutiva em bovinos de corte. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 59, n.1, p.1-13, 2010.
- MESACASA, A.C.; ZERVOUDAKIS, J.T.; ZERVOUDAKIS, L.K.H.; CABRAL, L.S.; ABREU, J.G.; LEONEL, F.P.; SILVA, R.P.; SILVA, R.F.G. Torta de girassol em suplementos múltiplos para bovinos em pastejo no período seco do ano: desempenho produtivo e viabilidade econômica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.13, n.4, p.1166-1179, 2012.
- NASCIMENTO, A.V.; CRISPIM, B.A.; SILVA, L.E.; BANARI, A.C.; SENO L.O.; GRISOLIA, A.B. Precocidade sexual em fêmeas da raça Nelore e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene receptor da leptina. In: ENCONTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2012, Dourados, MS. **Anais...** Dourados, MS, 2012.
- NOGUEIRA, G.P. Puberty in South American *Bos indicus* zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, Edinburg, v.82-83, p.361-372, 2004.
- PACHECO, A.; QUIRINO, C.R.; PINHEIRO, O.L.V.M.; ALMEIDA, J.V.C. Medidas morfométricas de touros jovens e adultos da raça Guzerá. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.9, n.3, p.426-435, 2008.
- PATERSON, C.M.; VILLANUEVA, E.C.; GREENWALD-YARNELL, M.; RAJALA, M.; GONZALEZ, I.E.; SAINI, N.; JONES, J.; MYERS, M.G. Leptin action via LepR-b Tyr1077 contributes to the control of energy balance and female reproduction. **Molecular Metabolism**, Garching, v.1, n.1-2, p.61-69, 2012.
- PAULA, N.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; CABRAL, L.S.; CARVALHO, D.M.G.; ZERVOUDAKIS, L.K.H.; MORAES, E.H.B.K.; OLIVEIRA, A.A. Frequência de suplementação e fontes de proteína para recria de bovinos em pastejo no período seco: desempenho produtivo e econômico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n.4, p.873-882, 2010.
- PELLEYMOUNTER, M.A.; CULLEN, M.J.; BAKER, M.B.; HECHT, R.; WINTERS, D.; BOONE, T.; COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, New York, v.28, n.269, p.540-543, 1995.
- PERRY, R.C.; CORAH, L.R.; COCHRAN, R.C.; BRETHOUR, J.R.; OLSON, K.C.; HIGGINS, J.J. Effects of hay quality, breed and ovarian development on onset of puberty and reproductive performance of beef heifers. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v.4, n.1, p.12-18, 1991.
- PFEIFER, L.F.M.; NELSON, A.S.; DIONELLO, J.L.; CORRÊA, M.N. Marcadores moleculares associados à reprodução animal. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v.14, n.1, p.05-09, 2008.
- SILVA, R.C.G.; FERRAZ, J.B.S.; MEIRELLES, F.V.; ELER, J.P.; BALIEIRO, J.C.C.; CUCCO, D.C.; MATTOS, E.C.; REZENDE, F.M.; SILVA, S.L. Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin and leptin receptor genes with growth and ultrasound carcass traits in Nelore cattle. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.11, n.4, p.3721-3728, 2012.
- SOUZA, E.J.O.; VALADARES FILHO, S.C.; GUIM, A.; VALADARES, R.F.D.; PAULINO, P.V.R.; FERREIRA, M.A.; TORRES, T.R.; LAGE, J.F. Taxa de deposição de tecidos corporais de novilhas Nelore e suas cruzas com Angus e Simental. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.13, n.2, p.344-359, 2012.
- SU, P.; YANG, S.; YU, J.; CHEN, S.; CHEN, J. Study of leptin levels and gene polymorphisms in patients with central precocious puberty. **Pediatric Research**, Baltimore, v.71, n.4, p.361-367, 2012.
- TRAKOVICKÁ, A.; MORAVČÍKOVÁ, N.; MILUCHOVÁ, M. The T945M single nucleotide polymorphism of the bovine Leptin receptor gene in population of Slovak Spotted Bulls. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v.76, n.3, p.161-164, 2011.
- VAZ, R.Z.; RESTLE, J.; VAZ, M.B.; PASCOAL, L.L.; VAZ, F.N.; BRONDANI, I.L.; ALVES FILHO, D.C.; NEIVA, J.N.M. Desempenho de novilhas de corte até o parto recebendo diferentes níveis de suplementação durante o período reprodutivo, aos 14 meses de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.41, n.3, p.797-806, 2012.
- WANG, P.G.; DENG, L.M.; ZHANG, B.Y.; CHU, M.X.; TAN, Y.; TAN, Y.; FAN, Q.; LIU, C.X. Identification of polymorphism on leptin receptor gene of goats in southwest China. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.96, n.1-2, p.120-125, 2011.
- ZIEBA, D.A.; AMSTALDEN, M.; MORTON, S.; MACIEL, M.N.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Regulatory roles of leptin at the hypothalamic-hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v.71, n.3, p.804-812, 2004.