

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

VARIAÇÃO NA RESPOSTA À KISSPEPTINA PARA
AVALIAÇÃO DE PRECOCIDADE SEXUAL EM
NOVILHAS NELORE

Ana Flávia Teresa Paiva

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

VARIAÇÃO NA RESPOSTA À KISSPEPTINA PARA
AVALIAÇÃO DE PRECOCIDADE SEXUAL EM
NOVILHAS NELORE

Ana Flávia Teresa Paiva

Orientador: Prof. Adjunto Guilherme de Paula Nogueira

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2018

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Paiva, Ana Flávia Teresa

P149v

Varição na resposta à kissseptina para avaliação de precocidade sexual em novilhas nelore/ Ana Flávia Teresa Paiva. Araçatuba: [s.n], 2018. 50 f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária, 2018

Orientador: Prof. Adjunto Guilherme de Paula Nogueira

1. Puberdade. 2. Nelore. 3. Hormônio Luteinizante. 4. Receptores de Kissseptina-1. I. T.

CDD 636.08977



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Variação na resposta à kisspeptina para avaliação de precocidade sexual em novilhas
nelore

AUTORA: ANA FLÁVIA TERESA PAIVA

ORIENTADOR: GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Adjunto GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Adjunta CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE
Curso de Zootenia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Câmpus de Dracena/Unesp


Prof. Dr. BAPAEIL SILVA CIPRIANO
Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 29 de junho de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA FLÁVIA TERESA PAIVA – nascida em Araçatuba-SP, no dia 15 de Janeiro de 1992. cursou ensino médio na escola "Afonso Pena", concluído em 2009. Ingressou no curso de Medicina Veterinária, pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), campus de Araçatuba e formou-se em 2014. Durante a graduação, realizou estágios, atividades de extensão universitária e foi bolsista de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob orientação da Prof. Adj. Dr. Tereza Cristina Cardoso. Atuou como médica veterinária "trainee" na empresa GeneTatuapé - comércio de genética bovina, de Abril de 2015 a Fevereiro de 2016. Atualmente atua como médica veterinária do NASF (Prefeitura Municipal de Barbosa), desde Dezembro de 2017. Em março de 2016, ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, sob orientação do Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira, com ênfase em fisiologia da reprodução e manipulação da puberdade de novilhas Nelore.

EPÍGRAFE

"Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam."

1 Coríntios 2:9

DEDICATÓRIA

A Deus, por sempre ter guiado meus passos para que este momento chegasse. Aos meus pais que tornaram tudo possível, meu irmão e amigos que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida, dificuldades e alegrias, todas estas, oportunidades de crescimento, evolução e formação de caráter.

Aos meus pais, Renato e Sália, pelo incondicional amor, por não medirem esforços pra eu chegar até aqui e me ensinarem o caminho do bem.

Ao meu irmão, André, pelas brigas, risadas, confidências e parceria inacabável. Além da maior jóia de nossas vidas: Marcela!

Aos amigos e familiares, por todo apoio emocional.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA-UNESP), e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, por ter me aceitado como orientada. Pela oportunidade de crescimento, e por me permitir explorar as minhas capacidades em todo momento. Muito obrigado.

À Fazenda Santa Encarnação por me receber tão bem e a todos os funcionários envolvidos nos trabalhos, Antônio, Ivan, Tiago A., Ney, Renato, Ramon, Lorraine, Paula, Nilza, Márcio, Wilson, Gilson, Tiago, Wesley por proporcionarem a realização desse projeto. Ficarei agradecida para sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos durante os primeiros meses de mestrado.

Ao Dr. Marcos Antônio Maioli e Prof. Dr. Rafael Silva Cipriano por terem participado da banca de qualificação e pelas contribuições, muito obrigado.

À Profa. Dra. Silvia Perri, pelas análises estatísticas durante o experimento.

À equipe do Laboratório de Endocrinologia Animal, por me ajudarem sempre que possível, com muita paciência e amizade. À Devani, por dosar com tanto carinho as minhas amostras. Ao Marcos Maioli, pelos ensinamentos e dosagem

do IGF-I. A Waneska, pela ajuda no laboratório, nos trabalhos de campo e na vida! Estarei agradecida sempre.

Ao doutorando João Ricardo Scaliante Jr e a graduanda Maria Isabela Azeredo, por sempre se prontificarem a ajudar nos trabalhos de campo, Obrigada pela amizade!

Ao Vitor Fava, por toda contribuição no âmbito profissional e pessoal. Partiu deixando muito amor e saudade. À família agradeço todo apoio e torcida!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Importância da puberdade na pecuária de corte.....	19
2.2 Mecanismo endócrino da puberdade.....	20
2.3 Síntese de kisspeptina.....	21
2.4 Kisspeptina no controle da reprodução e da puberdade.....	21
3 MATERIAL E MÉTODO.....	25
3.1 Local de experimento e animais.....	26
3.2 Aplicação de kisspeptina e coleta de sangue.....	26
3.3 Quantificação hormonal.....	28
3.4 Análise Estatística.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5 CONCLUSÃO.....	40
6 IMPLICAÇÃO.....	40
7 REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE ABREVIações

% = porcentagem

APVP = núcleo paraventricular anteroventral

ARC = núcleo arqueado

ASC = área sob a curva

CA = controle alto

CB = controle baixo

ER α = receptor de estrogênio alfa

EDTA= ácido etilenodiaminotetracético

EM = estação de monta

EPM = erro padrão da média

FSH = hormônio folículo estimulante

GH= hormônio de crescimento

GnRh= hormônio liberador de gonadotrofinas

GPR54 = receptor de kisspeptina

IGF-I= fator de crescimento semelhante à insulina tipo I

IM= intramuscular

kg= quilograma

Kp-54 = kisspeptina 54

Kp-14 = kisspeptina 14

Kp-10 = kisspeptina 10

LH= hormônio luteinizante

mg= miligrama

mL= mililitro

ng= nanograma

P4 = progesterona

RIA= radioimunoensaio

RNAm= RNA mensageiro

rpm= rotações por minuto

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Área sob a curva (ng/min) para a concentração total de LH no período de coleta (ASC), e área sob a curva para o pico de secreção de LH (ASC pico) em resposta à administração intramuscular de diferentes doses de kisspeptina em bezerras da raça Holandes ou Gir (MACEDO, 2013).....23
- Tabela 2 - Comparativo da concentração de LH aos oito meses de idade com os meses seguintes, entre os grupos prenhe (n=38) e não prenhe (n=11), analisado a partir de test t. Dados apresentados como média±EPM.....31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Relação temporal entre a expressão de GPR54 nos neurônios de GnRH (a), neurônios de GnRH com aposição de kisspeptina (b) e neurônios secretores de kisspeptina no núcleo periventricular anteroventral (AVPV) (c) durante o desenvolvimento pós-natal do camundongo. A puberdade nesta espécie: aos 30 a 35 dias de vida (CLARKSON et al., 2010).....22
- Figura 2 - Animais numerados na região lombar com tinta xadrez, aguardando a coleta de sangue, 20 min após aplicação de kisspeptina.....25
- Figura 3 - Comparativo das concentrações plasmáticas de LH, mensuradas 20 min após a aplicação de 10µg/kg de kisspeptina exógena. (A) grupo leve (174kg) e pesado (232kg), de acordo com peso a desmama. (B) grupo prenhe e não prenhe. Dados apresentados como média±EPM.....29
- Figura 4 - Comparativo das concentrações plasmáticas de P4. (A) grupo leve (174kg) e pesado (232kg), de acordo com peso a desmama. (B) grupo prenhe e não prenhe. Dados apresentados como média±EPM.....30
- Figura 5 - Comparativo de peso médio mensal dos 8 aos 16 meses de idade. (A) grupo leve (174kg) e pesado (232kg), de acordo com peso a desmama. (B) grupo prenhe e não prenhe. Dados apresentados como média±EPM.....32

Figura 6 - Tempo gestacional médio estimado aos 30 dias após o fim da estação de monta em novilhas Nelore separadas em leves (n=24, 174kg) e pesadas (n= 25, 232kg) de acordo com peso a desmama. Dados apresentados como

média±EPM.....33

Figura 7 - Comparativo das concentrações plasmáticas de IGF-I. (A) grupo leve (174kg) e pesado (232kg), de acordo com peso a desmama. (B) grupo prenhe e não prenhe. Dados apresentados como

média±EPM.....35

Figura 8 - Comparativo das concentrações plasmáticas de leptina. (A) grupo leve (174kg) e pesado (232kg), de acordo com peso a desmama. (B) grupo prenhe e não prenhe. Dados apresentados como

média±EPM.....37

VARIAÇÃO NA RESPOSTA A KISSPEPTINA PARA AVALIAÇÃO DE PRECOCIDADE SEXUAL EM NOVILHAS

RESUMO - Objetivou-se comparar a concentração de LH plasmático, em resposta à kisspeptina exógena, em novilhas Nelore, para avaliar a maturação sexual do Sistema Nervoso Central. As hipóteses testadas foram de que em resposta a kisspeptina, a secreção de LH aumenta com a idade e que em uma mesma idade, novilhas com maior peso à desmama secretam mais LH que as desmamadas mais leves. Utilizou-se 50 bezerras, segregadas em leves (174kg) e pesadas (232kg), desafiadas mensalmente dos 8 aos 16 meses, com 10 µg/kg (IM) de kisspeptina recombinante bovina, e após 20 min foi realizada a coleta de sangue. Aos 16 meses as novilhas foram expostas a touros por 60 dias e 30 dias depois a taxa de prenhez foi avaliada. A quantificação de LH, P4 e leptina foi feita por radioimunoensaio e IGF-I por ELISA. Houve aumento na concentração de LH em resposta a kisspeptina dos 8 aos 14 meses de idade. Comparando diferença na concentração de LH entre o 8º mês com meses os subsequentes, observou-se aumento no grupo prenhe no 11º mês, e no grupo não prenhe no 12º mês. A taxa de prenhez no grupo pesado foi de 92% enquanto que no grupo leve foi de 62,5% e o tempo gestacional estimado foi maior no grupo pesado. A concentração do IGF-I foi maior aos 12 meses no grupo leve e aos 15 meses no grupo não prenhe, enquanto que a concentração de leptina foi maior no grupo pesado aos 13, 15 e 16 meses, e prenhe aos 9 e 10 meses. A concentração de LH após a kisspeptina aumentou com a idade, mas não foi maior nos animais mais pesados à desmama, mas foi capaz de avaliar a maturação sexual do hipotálamo e futuramente pode ser usada para a triagem de novilhas Nelore com precocidade sexual.

Palavras-chave: puberdade, Nelore, hormônio luteinizante, receptores de kisspeptina-1

LH CONCENTRATION VARIATION AFTER KISSPEPTIN INJECTION FOR SEXUAL PRECOCITY EVALUATION IN NELLORE HEIFER

SUMMARY – The objective was to compare the plasma luteinizing hormone (LH) concentration in response to exogenous kisspeptin in Nellore heifers in order to evaluate the sexual maturation of the Central Nervous System. The tested hypotheses were: in response to kisspeptin the LH secretion increases with age and at the same age, heifers with higher weaning weight secrete more LH compared to lighter ones. Fifty heifers were used, secreted in light (174kg) and heavy (232kg), challenged monthly from 8-16 mo, with 10 µg / kg (IM) of recombinant bovine kisspeptin, and after 20 min blood sample was collected. At 16 months the heifers were exposed to bulls for 60 days, the pregnancy was evaluated 30 days later. The LH, P4 and leptin quantification were done by radioimmunoassay and IGF-I by ELISA. There was an increase in LH concentration in response to kisspeptin from 8th to 14th months of age. Comparing the difference on LH concentration between the 8th with the following months, the pregnant group presented an increase at 11th whereas the non-pregnant group it was observed at 12th month. The heavy heifers pregnancy rate was 92% while in the light group it was 62.5% and gestational time was also higher in the heavy group. IGF-1 levels was greater at 12th mo in the light group and at 15th mo in non-pregnant group. Leptin level was higher at 13th, 15th and 16th mo in the heavy group and at 9th and 10th mo in pregnant group. The LH concentration after kisspeptin injection increased according to age, was not higher in heavier animals at weaning, but was able to evaluate hypothalamus sexual maturation and in the future can be used as a screening tool for sexual precocity in Nellore heifers.

Keywords: puberty, Nellore, luteinizing hormone, receptors kisspeptin-1

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional é acompanhado pelo aumento na demanda de proteína animal, como a carne bovina, mercado com importante participação do Brasil. O rebanho bovino brasileiro, maior do mundo em escala comercial, teve crescimento de 1,6% em 2011, totalizando mais de 210 milhões de cabeças (IBGE, 2012). Segundo Cardoso e Nogueira (2007), o Brasil tem como principal raça bovina de corte o Nelore, que representa 70% do rebanho nacional. Esta escolha por animais zebuínos é realizada porque estes animais são mais bem adaptados às regiões de clima tropical, quando comparados às raças taurinas, estas por sua vez adaptadas à regiões de climas temperados (BÓ et al., 2003).

Uma consequência indesejada do aumento da tolerância às pressões ambientais tem sido uma diminuição da produtividade e precocidade. A puberdade no zebu sul-americano ocorre aos 22-36 meses e a idade ao primeiro parto é de cerca de 44-48 (NOGUEIRA, 2004). Essa idade avançada ao primeiro parto reduz o retorno econômico da bovinocultura de corte. Com o atraso da idade ao primeiro parto, ocorre uma menor produção de bezerros durante a vida produtiva da vaca. Além disso, novilhas com idade avançada à puberdade permanecem na fazenda ocupando áreas de pastagens que poderiam ser destinadas a outras categorias (FERREIRA et al., 2012; ELER et al., 2010).

As pesquisas em reprodução bovina vêm sendo realizadas em busca da melhoria de índices, como taxa de prenhez e idade à primeira cria. A última, em particular, está diretamente relacionada com a idade à puberdade, definida, em novilhas, como a primeira ovulação (NOGUEIRA, 2004). Os mecanismos endócrinos envolvidos na puberdade ainda não estão bem esclarecidos em *Bos indicus*, mas estudos em maturação sexual deram um grande passo com a descoberta da função da kisspeptina na puberdade (DE ROUX et al., 2003;

SEMINARA et al., 2003), a qual é capaz de estimular a secreção de GnRH e consequentemente a secreção de hormônio luteinizante (LH). Tendo em vista essa necessidade de melhoria da eficiência reprodutiva do rebanho bovino nacional, objetivou-se comparar a secreção de LH em novilhas Nelore pré-púberes, mais pesadas e mais leves à desmama, em resposta à kisspeptina exógena, como forma de avaliar a maturação sexual do Sistema Nervoso Central.

O estudo foi baseado em publicações usando camundongo como modelo, que relatam a necessidade do aparecimento dos receptores para kisspeptina como limitante para a ocorrência da primeira ovulação. As hipóteses são: 1) a resposta dos animais à kisspeptina aumenta com a idade com a aquisição de receptores GPR54 nos neurônios secretores de GnRH e 2) em uma mesma idade, novilhas com maior peso à desmama têm maior resposta à kisspeptina que aquelas mais leves. A comprovação das hipóteses estabelecidas possibilitará a criação uma ferramenta para seleção de bovinos precoces. O método consiste na avaliação da concentração de LH de fêmeas bovinas pré-púberes em resposta à kisspeptina exógena. Quanto maior a concentração de LH, em uma mesma idade, mais precoce deverá ser a novilha.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da puberdade na pecuária de corte

A puberdade na fêmea ocorre quando um animal adquire a capacidade de ovular associada com o comportamento estral, seguida do desenvolvimento e manutenção de um corpo lúteo funcional (KINDER et al., 1987). A puberdade pode ser definida como o início da vida reprodutiva do animal. Diante desta definição, a idade à puberdade pode ser vista como um limitador econômico na

pecuária de corte (FERRAZ JUNIOR, 2014). Segundo Jainudeen e Hafez (2004), se submetidas a manejo nutricional adequado as novilhas zebuínas alcançam a puberdade, geralmente, entre os 18 e 24 meses de idade, enquanto que nas raças européias a primeira ovulação ocorre entre 11 e 15 meses de idade. Em sistemas extensivos de criação de gado de corte, na maioria dos rebanhos brasileiros, há dificuldade em identificar o momento exato da primeira ovulação. Um índice que pode ser usado para inferir a idade à puberdade é a idade ao primeiro parto, que ocorre em torno de 40 meses no gado zebuíno brasileiro (CARDOS; NOGUEIRA, 2007). Um trabalho de simulação mostrou que a redução da idade ao primeiro parto de 3 para 2 anos pode aumentar o retorno econômico do sistema em 16%, pois ao se reduzir a idade ao primeiro parto em um ano, reduz-se o custo de um ano de recria e aumenta de 0,5 a 0,8 bezerras por vaca durante sua vida produtiva (ELER et al., 2010). Além disso, Franco (2005) citou que ao iniciar a reprodução de novilhas aos 2 ou 3 anos implica em manter um rebanho de 24 a 48% maior, respectivamente, que rebanhos com novilhas cobertas aos 15 meses de idade.

2.2 Mecanismo endócrino da puberdade

A idade à primeira ovulação é regulada por diversos fatores neuroendócrinos. O hipotálamo é responsável pela produção e secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que quando liberado nos capilares do sistema porta-hipofisário alcança a hipófise e estimula a produção e secreção de gonadotrofinas (WHITLOCK, 2011). A adenohipófise é responsável pela produção e secreção de hormônio folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), ambos reguladores da gametogênese e esteroidogênese tanto em machos e fêmeas (WHITLOCK, 2011).

A contenção da atividade gonadal em bovinos antes da puberdade pode ser explicada pela “Hipótese Gonadostática”, consequência do excesso de retroalimentação negativa do estradiol no hipotálamo, inibindo a secreção de GnRH e conseqüentemente de gonadotrofinas (CARDOS; NOGUEIRA, 2007). Uma necessidade para a primeira ovulação é o aumento da secreção de

GnRH, que ativa o eixo hipofisário-gonadal aumentando a secreção de LH (TENASEMPERE, 2012). Isto ocorre pela diminuição da retroalimentação negativa do estradiol no hipotálamo, o que culmina com a primeira ovulação (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007; MAQUIVAR, 2011). Nesse período o estradiol, passa a exercer efeito de retroalimentação positiva no hipotálamo provocando um pico de LH no final da fase folicular que resulta na ovulação (SMITH et al., 2009a). Os neurônios GnRH são os componentes principais do eixo reprodutivo, porém não expressam os receptores para estrógeno (ER α) e progesterona (P4) que exercem os efeitos de retroalimentação deste hormônio (SKINNER et al., 2001). Acredita-se que a kisspeptina esteja envolvida na transmissão de sinais de retroalimentação fisiológicos para os neurônios GNRH interferindo na liberação pulsátil do GnRH/LH (SMITH, 2012).

2.3 Síntese de kisspeptina

O gene Kiss-1 codificador da kisspeptina, foi descoberto inicialmente como supressor de metástase em melanoma maligno humano e posteriormente associado a reprodução. Este gene codifica uma proteína hidrofóbica com 145 aminoácidos (prepro-kisspeptina), que após primeira clivagem proteolítica forma a kisspeptina-54 (Kp-54), a maior kisspeptina já identificada com 54 aminoácidos (KOTANI et al., 2001; OHTAKI et al., 2001). A partir da kisspeptina-54, são originados outros peptídeos como kisspeptina-14 (Kp-14) e a kisspeptina-10 (Kp-10).

A ação das kisspeptinas nas células ocorre através da ligação e ativação de um receptor acoplado a proteína G, o GPR54, atualmente mais chamado de Kiss1r (SMITH, 2012). Todas as formas de kisspeptina podem ativar eficientemente esse receptor, mas a Kp-10 retém a atividade máxima em termos de ativação (KOTANI et al., 2001).

2.4 Kisspeptina no controle da reprodução e da puberdade

As primeiras publicações relacionando o papel da kisspeptina na puberdade ocorreram em 2003. Pesquisadores observaram que mutações com

perda de função do gene GPR54 (receptor para kisspeptina) causam hipogonadismo hipogonadotrófico em humanos e camundongos (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003). Dentre as pesquisas que evidenciam o papel da kisspeptina na secreção de GnRH estão a produção de receptores de kisspeptina nos neurônios GnRH (HAN et al., 2005, SMITH et al., 2009b), a presença de terminações dos neurônios kisspeptina sobre os neurônios GnRH (CLARKSON; HERBISON, 2006) e a ação direta no aumento da excitabilidade dos neurônios GnRH (HAN et al., 2005).

A kisspeptina exerce um potente efeito estimulatório sobre a secreção de GnRH e gonadotrofinas. Quando administrada, aumenta a secreção de FSH e LH tanto em bezerros machos quanto fêmeas (EZZAT AHMED et al., 2009) e resultados similares foram encontrados em ovelhas (SMITH et al., 2009b), macacos (SHAHAB et al., 2005) e humanos (DHILLO et al., 2005). Em vacas, a resposta à kisspeptina foi mais evidente na concentração de LH plasmático do que na concentração de FSH (NANIWA et al., 2013). Em ratos, o LH apresentou resposta rápida e aumentou em quase 10 vezes em relação aos níveis basais, enquanto que o FSH demonstrou uma resposta com maior atraso e menor magnitude. A capacidade de resposta do FSH ao Kp-10 parece ser aproximadamente 200 vezes menos sensível que a de LH (NAVARRO et al., 2005a, 2005b).

Há um efeito dose-dependente da kisspeptina exógena em estimular a secreção de FSH e LH em ratos, ovelhas, macacos e humanos (DUNGAN et al., 2006), porém em alguns estudos, a administração de doses mais altas de kisspeptina levaram a uma menor resposta de LH. Isso pode ocorrer devido uma dessensibilização rápida do hipotálamo a nível do seu próprio receptor (GEORGE et al., 2011), após uma continuada exposição à kisspeptina (SEMINARA et al., 2006, RAMASWAMY et al., 2007). De ação rápida, o pico da concentração de LH em bovinos ocorre 20 minutos após a administração de kisspeptina por via intramuscular (EZZAT AHMED et al., 2009).

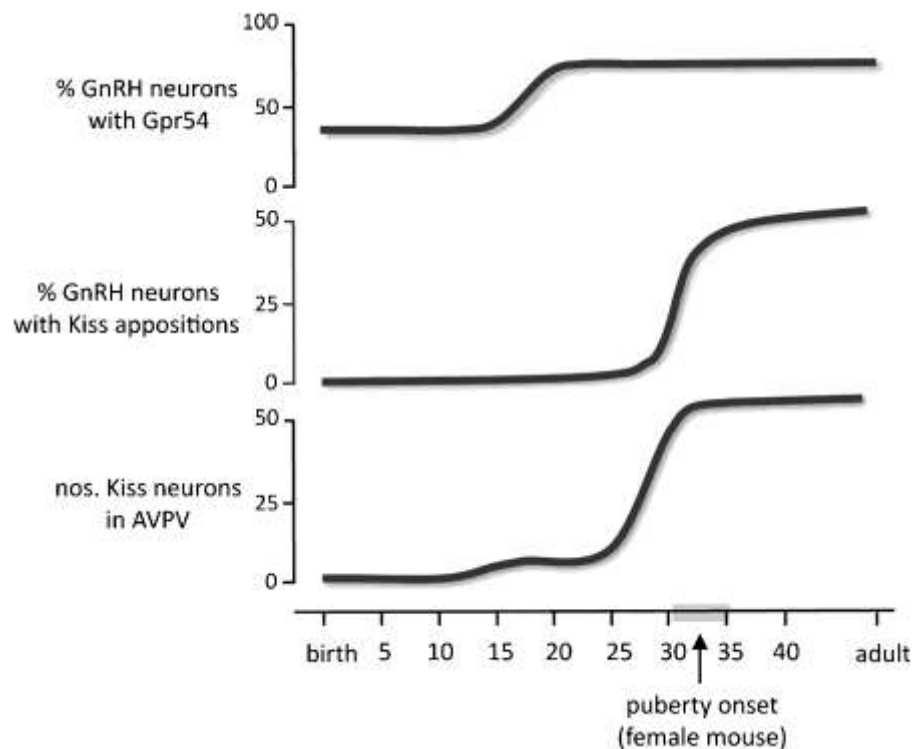
A participação da kisspeptina na puberdade em camundongos ocorre em três estagios, primeiro há o aumento da quantidade de mRNA de GPR54 nos

neurônios secretores de GnRH, depois estes neurônios respondem ao estímulo do GPR54 e por fim ocorre a aposição dos neurônios secretores de kisspeptina com os neurônios secretores de GnRH (CLARKSON et al., 2010). Durante a puberdade, a ativação dos neurônios secretores de GnRH ocorre em duas etapas: 1) aumenta a possibilidade de secreção de kisspeptina estimulada pelo estradiol (receptores α) e 2) o estabelecimento da capacidade dos neurônios de GnRH em responder à kisspeptina (receptores GPR54).

Foi demonstrado em ovelhas, a participação dos neurônios secretores de kisspeptina na retroalimentação positiva do estradiol estimulando a secreção de GnRH, resultando no pico preovulatório de LH (SMITH et al., 2009b). De fato, foram descritos receptores para estradiol (ER α) nos neurônios secretores de kisspeptina (BLISS et al., 2010; D'ANGLEMONT DE TASSIGNY; COLLEDGE, 2010). Estes achados ajudam a explicar porque os neurônios secretores de GnRH não possuem receptores para estradiol nem para progesterona, fortalecendo a ideia de que existe um componente intermediário na retroalimentação dos esteróides gonadais no hipotálamo (SMITH et al., 2009b).

Camundongos com hipogonadismo hipogonadotrófico, por ausência congênita de kisspeptina, podem ter seu fenótipo restabelecido com a administração do peptídeo, o que não ocorre naqueles em que a doença ocorre devido à falta de GPR54 (BLISS et al., 2010). Com a aproximação da puberdade há um aumento da porcentagem de neurônios secretores de GnRH responsivos à kisspeptina (HAN et al., 2005). De forma ilustrativa, o desenvolvimento do sistema neuroendócrino relacionado com a maturação sexual envolvendo a kisspeptina no camundongo pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Relação temporal entre a expressão de GPR54 nos neurônios de GnRH (a), neurônios de GnRH com aposição de kisspeptina (b) e neurônios secretores de kisspeptina no núcleo periventricular anteroventral (AVPV) (c) durante o desenvolvimento pós-natal do camundongo. A puberdade nesta espécie: aos 30 a 35 dias de vida (CLARKSON et al., 2010).



A secreção de LH em resposta à kisspeptina foi comparada em novilhas pre-púberes da raça Gir (6-10 meses) com novilhas de peso semelhante (~215 kg) da raça Holandesa (4-8 meses) por Gustavo Guerino Macedo (2013). Essas novilhas foram tratadas com diferentes doses de kisspeptina intramuscular e as amostras de sangue foram colhidas seriadamente antes e até 270 minutos após a injeção de kisspeptina. A concentração de LH plasmático foi avaliada e os resultados estão apresentados na Tabela.1.

Tabela 1 - Área sob a curva (ng/min) para a concentração total de LH no período de coleta (ASC), e área sob a curva para o pico de secreção de LH (ASC pico) em resposta à administração intramuscular de diferentes doses de kisspeptina (ug/kg) em bezerras da raça Holandes ou Gir (MACEDO, 2013).

	ASC		ASC pico	
	Gir (n=24)	Hol (n=24)	Gir (n=24)	Hol (n=24)
Kp2,5 ug/kg	58,6±7,7 ^{aA}	116,2±18,2 ^{aB}	26,8±3,4 ^{aA}	50,8±11,5 ^{aA}
Kp5,0 ug/kg	73,7±21,2 ^{aA}	204,5±55,1 ^{aB}	35,9±10,4 ^{aA}	96,2±28,2 ^{aB}
Kp10,0 ug/kg	172,1±27,9 ^{bA}	457,8±91,7 ^{bB}	84,5±13,6 ^{bA}	223,4±44,2 ^{bB}

*letras minúsculas indicam diferença entre linhas e letras maiúsculas indicam diferença entre colunas.

Chama a atenção o fato dos animais da raça Gir secretarem menos que duas vezes a quantidade de LH secretada pelos animais da raça Holandêsa, mesmo sem diferença de peso. Essa diferença na concentração de LH em resposta à kisspeptina pode ser consequência da diferença na quantidade de receptor (GPR54) para kisspeptina nos neurônios secretores de GnRH.

Considerando as observações em camundongo com as relatadas por Macedo elaboramos o presente projeto buscando avaliar se a resposta à kissptina aumenta com a idade das novilhas e se novilhas que atingem a puberdade mais cedo respondem mais à kisspeptina que novilhas tardias.

3 MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba processo FOA-2013-01224.

3.1 Local de experimento e animais

O experimento foi realizado na Fazenda Santa Encarnação, em Bataguassu, Mato Grosso do Sul, Brasil, 21°43'13.692" de latitude sul, 52°25'46.823" de longitude oeste e 349 metros de altitude. A fazenda é utilizada para seleção de precocidade como desafio de novilhas aos 16 meses, abate de animais que não emprenham na primeira IATF além da seleção de reprodutores através de DEPs para precocidade. As atividades foram realizadas de maio de 2015 a janeiro de 2016.

De 184 fêmeas da raça Nelore recém-desmamadas, aos oito meses de idade, foram segregadas as 25 mais leves com pesos entre 165 e 182 kg ($174 \pm 1,47$ kg) e 25 mais pesadas com pesos entre 222 e 251 kg ($232 \pm 1,06$ Kg), de acordo com peso a desmama. O objetivo de se utilizar os extremos da população foi o de aumentar a chance de variação da idade à prenhez. As novilhas permaneceram durante todo período experimental em um único lote, em pastejo rotacionado com *Brachiaria decumbens*, com acesso a suplemento mineral e água *ad libitum*.

As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia da Unesp – Câmpus de Araçatuba.

3.2 Aplicação de kisspeptina e coleta de sangue

As cinquenta fêmeas foram desafiadas uma vez ao mês, por nove meses (8 à 16 meses de idade), com kisspeptina exógena (kisspeptin-10, American Peptides®; 10 µg/kg, IM) e a coleta de sangue foi feita vinte minutos após sua aplicação. Esse foi o intervalo relatado por Ezzat (2009) que observou o máximo de secreção de LH depois de 20 minutos da aplicação da kisspeptina exógena.

Para viabilizar um manejo que permitisse o desafio com kisspeptina de um maior número de animais, sem a necessidade de esperar 20 minutos após a administração com o animal no tronco de contenção, foi desenvolvido um protocolo de manejo descrito a seguir. À medida que os animais entravam na seringa, estes eram numerados com tinta xadrez na região lombar e o número

de identificação (brinco) era anotado em uma planilha correspondendo à numeração da lombar. A kisspeptina exógena, diluída em solução salina, era então administrada com intervalo de 2 a 5 minutos entre os animais, e o horário de aplicação e coleta anotados para cada animal. Gradativamente, com o tempo de espera entre a administração do fármaco e a coleta do sangue, os animais entravam no tronco de contenção para a coleta de sangue. Buscamos elaborar um procedimento o mais simples possível para que pudesse ser aplicado em larga escala facilitando o manejo da fazenda.

Figura 2 - Animais numerados na região lombar com tinta xadrez, aguardando a coleta de sangue, 20 min após aplicação de kisspeptina.



Em quatro dos nove meses de experimento (aos 8, 12, 15 e 16 meses de idade) os animais foram pesados após a coleta de sangue. As pesagens coincidiam com os meses de menor intensidade das atividades na fazenda. A partir destas pesagens, estimamos o peso das novilhas nos meses restantes, por meio de uma equação de primeiro grau, e com essas estimativas o ganho de peso diário.

O sangue foi coletado em tubos de ensaio com EDTA +NaF (6 mg+12 mg; BD Vacutainer®), sendo armazenado sob refrigeração a 4°C até centrifugação. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 15 min (centrífuga Fanen Exelsa Baby I modelo 206) para obtenção do plasma, que foi aliquotado em tubos Axygen Scientific MCT-200B em duplicata. Estas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a quantificação hormonal.

Aos 16 meses, as novilhas foram expostas a touros Nelore (previamente avaliados) na proporção de 25:1, onde permaneceram em estação de monta por 60 dias. Trinta dias após o final da estação de monta, foi realizado o diagnóstico de gestação por ultrassonografia e foi estimada a idade gestacional dos fetos.

3.3 Quantificação hormonal

As concentrações de LH foram mensuradas por radioimunoensaio adaptado “*in house*” (BOLT; ROLLINS, 1983). Em todos os ensaios foi realizada a dosagem de duas concentrações de Controle Alto (5,258 ng/ml) e duas de Controle Baixo (1,991 ng/ml). Foi calculado o coeficiente de variação inter (CA: 15,55% CB: 20,41%), intraensaio (CA: 23,29% CB: 25,60%) e os limites de detecção e de quantificação que foram de 0,72 e 0,94 ng/ml, respectivamente.

A leptina foi mensurada por radioimunoensaio “*in house*” adaptado do descrito por Beltran (2007). Em todos os ensaios foi realizada a quantificação de duas concentrações de Controle Alto (27,476 ng/ml) e duas de Controle Baixo (1,743 ng/ml). Coeficiente de variação inter (CA:11,61% CB: 23,14%),

intraensaio (CA: 9,84% CB: 23,94%) e limites de detecção e quantificação de 0,79 e 2,22 ng/ml, respectivamente.

A concentração de progesterona foi obtida utilizando kit comercial de RIA (RIA Progesterone, ImmuChem™ Double Antibody®). Foi realizada em todos os ensaios a dosagem de duas concentrações de Controle Alto (9,50 ng/mL) e dois Controle Baixo (0,30 ng/mL). Coeficiente de variação inter (CA: 17,7% CB: 15,02%), intraensaio (CA: 14,09% CB: 5,92%) e limites de detecção e quantificação de 0,41 e 0,35 ng/ml, respectivamente.

A concentração de IGF-I foi obtida através de ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA) “in house”, descrito por Maioli e Nogueira (2017). Coeficiente de variação inter (CA: 12,8% CB: 17,17%), intraensaio (CA: 7,35% CB: 10,95) e limites de detecção e quantificação de 1,90 e 5,77 ng/ml, respectivamente.

3.4 Análise Estatística

As comparações de LH, IGF-I e leptina entre os grupos leve e pesado, e prenhe e não prenhe, assim como as comparações da concentração de LH em diferentes idades, foram realizadas pelo test t não pareado.

As comparações de peso e ganho de peso diário entre os grupos leve e pesado, e prenhe e não prenhe, foram realizadas pelo test t não pareado.

A comparação do tempo gestacional entre os grupos leve e pesado foi feito pelo teste t não pareado.

Os resultados das análises estatísticas foram apresentados como média e erro padrão e foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa GraphPad Prism 6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

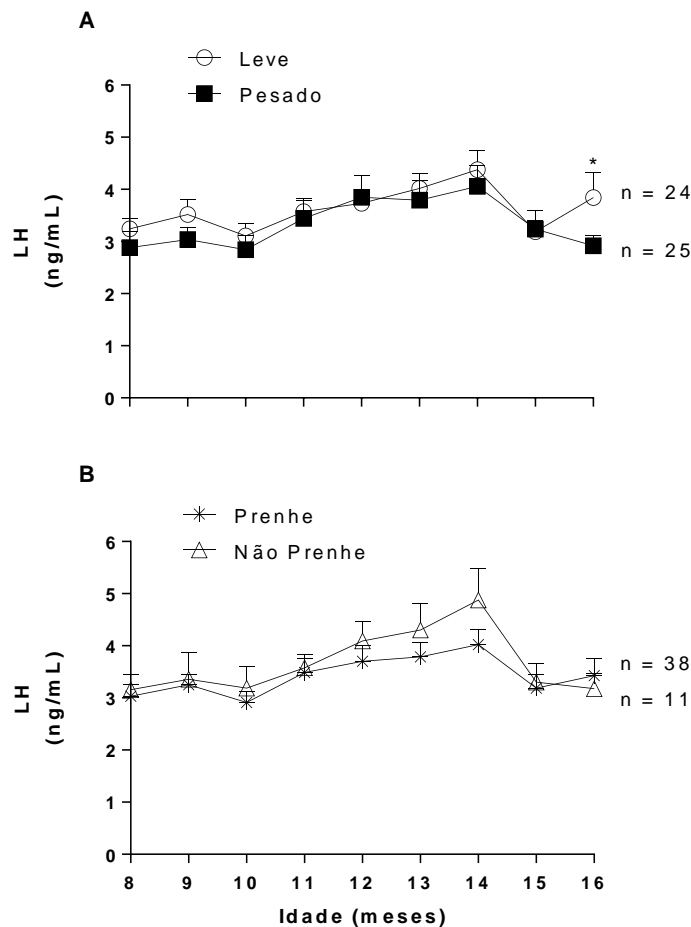
A kisspeptina é considerada um forte estimulador da secreção de GnRH/LH (TENA-SEMPERE, 2010) e a mais importante descoberta na neuroendocrinologia após o isolamento do GnRH (revisado por ROA et al., 2008).

A kisspeptina apresenta papel crucial na regulação da secreção do GnRH, e assim, conseqüentemente, das gonadotrofinas LH e FSH (DHILLO et al., 2005; HASHIZUME et al., 2010). Isto tem sido mostrado em ratos (MATSUI et al., 2004; NAVARRO et al., 2005), humanos (DHILLO et al., 2000, 2005), e macacos (SHAHAB et al., 2005), contudo em bovinos apenas dois estudos foram realizados (KADOKAWA et al., 2008; WHITLOCK et al., 2008).

Na Figura 3 observamos uma alta concentração de LH em resposta a kisspeptina logo no primeiro mês de coleta ($3,06 \pm 0,19$ ng/ml). A média da concentração plasmática de LH em bezerras Nelore aos oito meses de idade foi de 0,73 ng/ml (CARDOSO et al., 2009). Esse aumento de 419% na concentração de LH em relação a concentração basal, demonstra que as bezerras responderam a kisspeptina exógena nesta idade.

Houve um aumento da resposta a kisspeptina exógena ao longo do tempo ($p < 0,0001$) que sugere a confirmação de nossa hipótese de que a resposta à mesma dose de kisspeptina aumenta com a idade provavelmente pelo aumento na quantidade de receptores GPR54 para kisspeptina nos neurônios secretores de GnRH. Neste experimento a concentração basal de LH, antes da aplicação de kisspeptina não foi avaliada, uma vez que o objetivo do experimento foi buscar uma metodologia que permitisse identificar animais com puberdade precoce, a avaliação dos níveis basais inviabilizaria o manejo de administração e coleta de sangue.

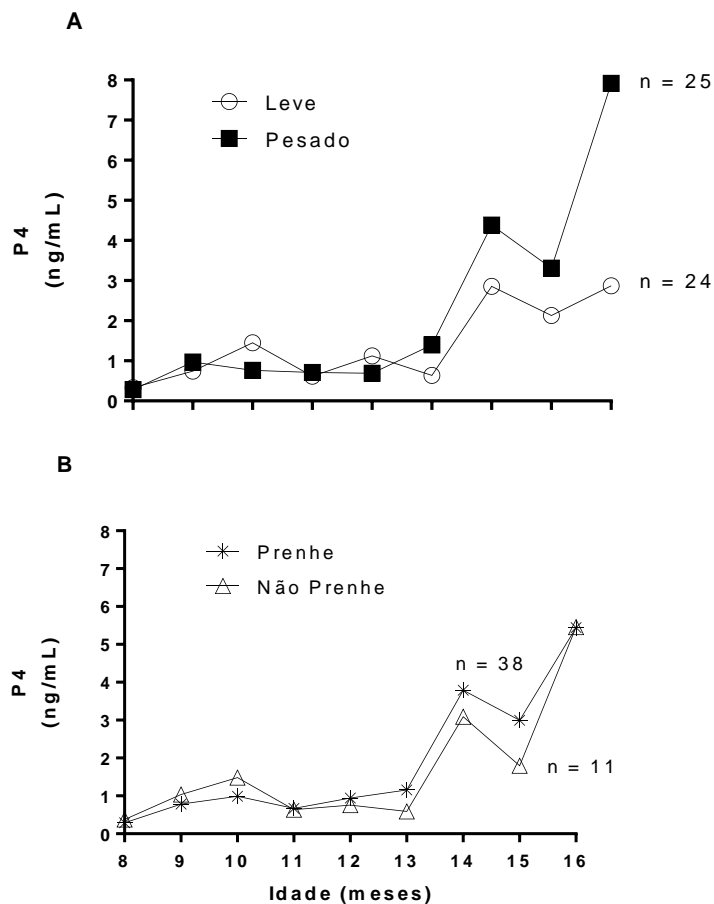
Figura 3 - Comparativo das concentrações plasmáticas de LH, mensuradas 20 min após a aplicação de 10µg/kg de kisspeptina exógena. (A) grupo leve (174kg) e pesado (232kg), de acordo com peso a desmama. (B) grupo prenhe e não prenhe. Dados apresentados como média±EPM.



Foi possível observar uma diminuição na concentração de LH nas novilhas mais pesadas e nas novilhas que ficaram prenhes, uma suposição é a de que nesses grupos os animais começaram a ovular antes que as novilhas mais leves e não prenhes. O antecipado aumento da concentração de progesterona nesses grupos suprimiu a resposta à kisspeptina em alguns

animais, esse efeito ficou mais evidente no 15º mês de idade quando a maioria dos animais provavelmente já havia ovulado (Figura 4).

Figura 4 - Comparativo das concentrações plasmáticas de P4. (A) grupo leve (174kg) e pesado (232kg), de acordo com peso a desmama. (B) grupo prenhe e não prenhe. Dados apresentados como média±EPM.



Comparamos a concentração de LH aos oito meses, com os meses seguintes para buscar o mês de maior efeito da kisspeptina e menor efeito da progesterona, os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparativo da concentração de LH aos oito meses de idade com os meses seguintes, entre os grupos prenhe (n=38) e não prenhe (n=11), analisado a partir de test t. Dados apresentados como média±EPM.

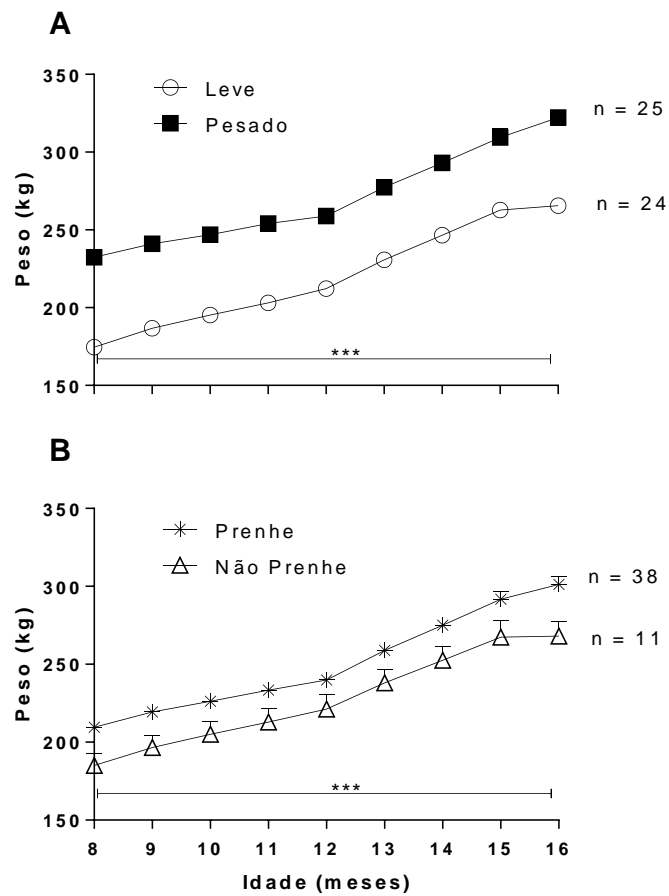
Grupos	Concentração de LH (ng/ml)					
	8	10	11	12	13	14
Prenhes	3,03 ± 0,23^a	2,91 ± 0,20^a	3,49 ± 0,27^b	3,70 ± 0,29^b	3,79 ± 0,27^b	4,02 ± 0,30^b
Não prenhes	3,16 ± 0,29^A	3,19 ± 0,41^A	3,58 ± 0,27^A	4,09 ± 0,38^B	4,30 ± 0,50^B	4,88 ± 0,61^B

*letras minúsculas indicam diferença entre os meses nos animais prenhes e letras maiúsculas indicam diferença entre os meses nos animais não prenhes.

Nas novilhas do grupo prenhe, a partir do 11º mês de idade a concentração de LH em resposta a kisspeptina exógena já diferiu da concentração à desmama ($p=0,03$), enquanto que no grupo não prenhe, essa diferença foi observada aos 12 meses de idade ($p=0,02$). A ferramenta de seleção para precocidade pode ser baseada na diferença de maturação do hipotálamo entre novilhas tardias ou precoces utilizando a concentração de LH em resposta à kisspeptina como referência, mas será necessária a utilização de um número maior de animais e outros estudos para comprovar essa hipótese.

Comparando a variação do peso entre os grupos leve e pesado, observou-se que houve diferença no peso a desmama que se manteve até o fim das coletas ($p<0,0001$), mas o ganho de peso diário não diferiu entre os grupos ($p=0,5712$) até os 15 meses, sendo maior no grupo pesado entre os 15 e 16 meses de idade ($p<0,05$), como mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Comparativo de peso médio mensal dos 8 aos 16 meses de idade. (A) grupo leve (174kg) e pesado (232kg), de acordo com peso a desmama. (B) grupo prenhe e não prenhe. Dados apresentados como média±EPM.

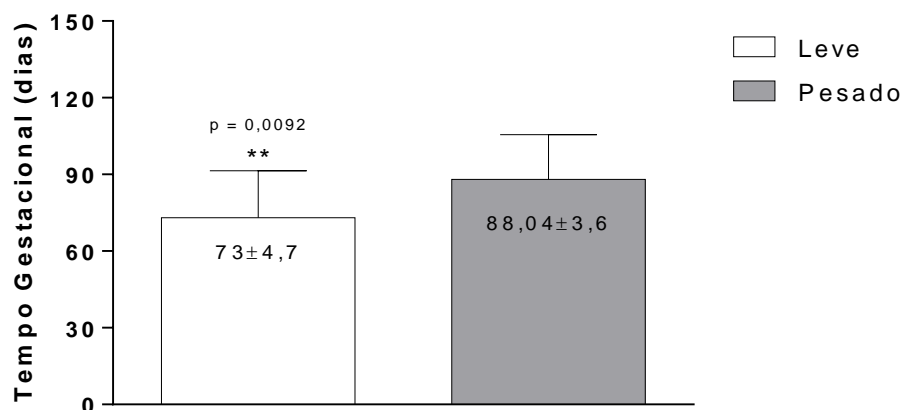


Em novilhas de corte, o mês de nascimento interfere na idade à puberdade, por interferir no ganho de peso pré-desmama. Novilhas mais leves à desmama são mais tardias que novilhas mais pesadas (DAY; NOGUEIRA, 2013). O grupo de maior peso à desmama apresentou uma taxa de prenhez de 92% (23/25) enquanto que o grupo leve teve 62,5% (15/24). Após o nascimento mecanismos endócrinos garantem o sistema reprodutivo fique contido até que

a bezerra possui um desenvolvimento somático compatível com a reprodução, próximo de 65-70% do peso adulto (SEMMELMANN et al., 2001). Sinais endócrinos indicando que o gasto de energia com o crescimento e desenvolvimento está diminuindo, permitem o direcionamento de nutrientes para a gestação, parto e lactação (NOGUEIRA, 2004).

No início da estação de monta, novilhas do grupo pesado que ficaram prenhes, estavam mais pesadas que as que ficaram prenhes no grupo leve (320 ± 5 kg vs 272 ± 4 kg), e, as que engravidaram no grupo leve estavam mais pesadas que as que não engravidaram (272 ± 4 kg vs 254 ± 4 kg). De acordo com a estimativa do tempo gestacional 30 dias após o final da estação de monta, as novilhas do grupo pesado engravidaram em média 15 dias mais cedo que as novilhas do grupo leve ($p=0,0092$, Figura 6).

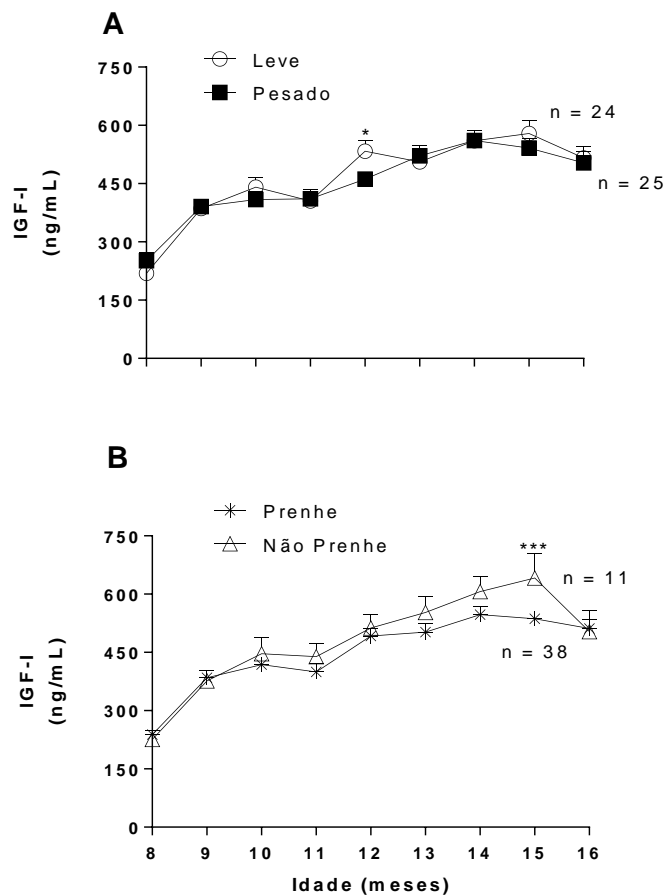
Figura 6 - Tempo gestacional médio estimado aos 30 dias após o fim da estação de monta em novilhas Nelore separadas em leves ($n=24$, 174kg) e pesadas ($n= 25$, 232kg) de acordo com peso a desmama. Dados apresentados como média \pm EPM.



Os neurônios Kiss1 são os principais componentes das vias neuroendócrinas pelos quais a homeostase energética e a reprodução estão funcionalmente acoplados (DIAS et al., 2009) e a restrição alimentar é associada com inibição da expressão do gene de kisspeptina (Kiss1) (CASTELLANO, 2005). Assim, a kisspeptina foi vista como um possível mediador entre status metabólico e eixo hipotálamo-hipófise-gônada (DUNGAN et al., 2006; SCHNEIDER, 2004). Por isso, quantificamos a concentração do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) nas amostras de plasma por variar em função da concentração de GH e ser um sinalizador do status energético do animal.

Sabe-se que a baixa concentração circulante de IGF-I (assim como a baixa de insulina) acarreta a diminuição da expressão do RNAm Kiss1 (HINEY et al., 2009; PRALONG, 2010), e que o IGF-I estimula a expressão do gene Kiss1 no AVPV (HINEY et al., 2009), portanto, comparamos a concentração do IGF-I no plasma entre os grupos leve e pesado, assim como entre as novilhas que ficaram prenhe ou não prenhe, para avaliar o possível efeito na fertilidade dos animais (Figura 7).

Figura 7 - Comparativo das concentrações plasmáticas de IGF-I. (A) grupo leve (174kg) e pesado (232kg), de acordo com peso a desmama. (B) grupo prenhe e não prenhe. Dados apresentados como média±EPM.



A concentração de IGF-I foi maior aos 12 meses nas novilhas que não ficaram prenhes e aos 15 meses nas novilhas mais leves à desmama.

O estímulo para síntese e secreção de IGF-I pelo fígado, o seu principal local produtor, é feito pelo GH (BUTLER; ROITH 2001) e uma hipótese é a de que as novilhas mais leves, incluindo as que novilhas que não engravidaram, ainda estariam em crescimento, ou seja, não haviam atingido o

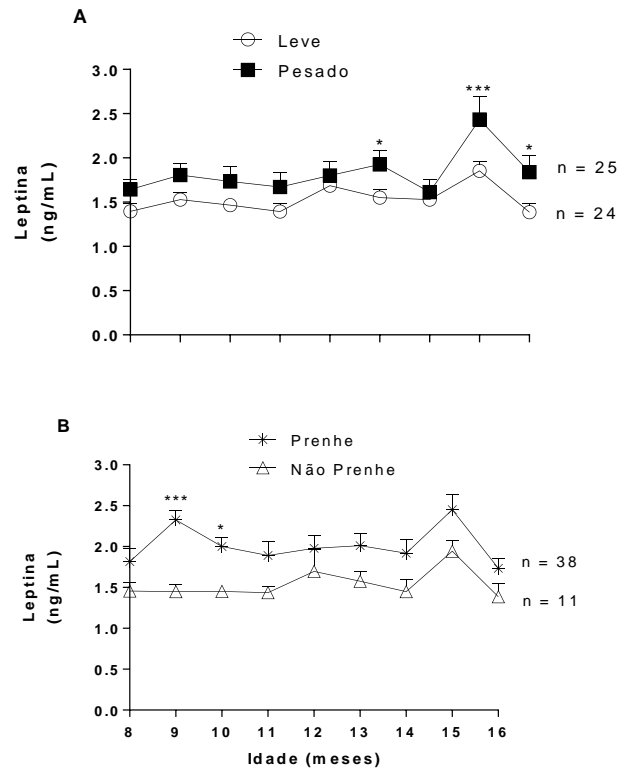
desenvolvimento somático ideal para início da reprodução, portanto, é de se supor que a concentração de GH esteja mais elevada nestes animais, refletindo na concentração de IGF-I.

Outro elemento que pode regular a produção de kisspeptina é a leptina, hormônio secretado por adipócitos que sinaliza ao SNC o status energético do animal.

A leptina atua como estimulador da expressão do Kiss1 no hipotálamo (CASTELLANO et al., 2006a). Seus receptores (Ob-R) são expressos no ARC e POA (BACKHOLER et al., 2010; SMITH et al., 2006), foram localizados nos neurônios secretores de kisspeptina, mas não estão presentes nos neurônios secretores de GnRH (QUENNELL et al., 2009; SMITH et al., 2009a), sugerindo que a kisspeptina atua como um neurotransmissor de um interneurônio modulando a liberação de GnRH. Uma redução na concentração de leptina diminui a expressão do gene Kiss1 no ARC (SMITH et al. 2006) e camundongos portadores de mutação no gene da leptina apresentaram diminuição na expressão de Kiss1 que foi revertida após o tratamento com leptina (LUQUE et al., 2007).

Os comparativos da concentração de leptina entre os grupos leve e pesado, e prenhe e não prenhe, estão na Figura 8.

Figura 8 - Comparativo das concentrações plasmáticas de leptina. (A) grupo leve (174kg) e pesado (232kg), de acordo com peso a desmama. (B) grupo prenhe e não prenhe. Dados apresentados como média±EPM.



Durante os meses de aplicação de kisspeptina e coleta de sangue, a concentração de leptina se manteve maior nas fêmeas mais pesadas à desmama aos 13, 15 e 16 meses de idade ($p < 0,0001$) quando comparado às fêmeas mais leves. As novilhas que ficaram prenhes apresentaram maior concentração de leptina aos 9 e 10 meses de idade quando comparadas com as novilhas que não engravidaram ($p < 0,0001$) e isso pode ser explicado mais uma vez pela diferença de peso entre esses animais.

5 CONCLUSÃO

A concentração de LH em resposta à kisspeptina exógena aumenta com a idade, mas essa resposta não é maior em animais mais pesados à desmama. A concentração de LH em resposta à kisspeptina exógena foi suficiente para identificar variação na maturação hipotalâmica entre fêmeas prenhes e não prenhes e pode ser um caminho para uma ferramenta de seleção para a precocidade.

6 IMPLICAÇÃO

A alta concentração de LH já no primeiro mês de coleta sugere a presença de muitos receptores para kisspeptina no SNC, incentivando a estender o experimento para animais mais jovens buscando o início do aparecimento dos receptores para kisspeptina como foi relatado para camundongos. Identificar os animais quanto à precocidade antes da desmama poderá ser ainda mais interessante do ponto de vista econômico na comercialização de bezerras.

7 REFERÊNCIAS

BACKHOLER, K.; SMITH J. T.; RAO A., PEREIRA A.; IGBAL J., OGAWA S.; LI Q.; CLARKE I. J. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. **Endocrinology**, v. 151, p. 2233–2243, 2010.

BELTRAN, M. P. **Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 106 f. 2007. Tese (Doutorado Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2007.

BLISS, S.P.; NAVRATIL, A.M.; XIE, J.; ROBERSON, M.S. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, p.322-340, 2010.

BÓ, G.; BARUSELLI, P.; MARTÍNEZ, M. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307–26. 2003.

BOLT, D.J.; ROLLINS, R. Development and application of a radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 146-154, 1983.

BUTLER, A. A.; ROITH, D. L. Control of growth by the somatropic axis: growth hormone and the insulin-Like growth factors have related and independent roles¹. **Annual Review of Physiology**, v. 63, p. 141-164, 2001.

CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G.P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 10, p. 59-67, 2007.

CARDOSO, D.; PEIRÓ, J. R.; NOGUEIRA, G. P. Concentração de LH em novilhas da raça nelore da desmama à primeira ovulação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 1277-1284, 2009.

CASTELLANO, J. M.; NAVARRO, V. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; NOGUEIRAS, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; VAZQUEZ, M. J.; VIGO, E.;

CASANUEVA, F. F.; AGUILAR, E.; PHINILLA, L.; DIEGUEZ, C.; TENA-SEMPERE, M. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. **Endocrinology**, v. 146, p. 3917–3925, 2005.

CASTELLANO, J. M.; NAVARRO, V. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; CASTAÑO, J. P.; MALAGÓN, M. M.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; MAGNI, P.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 257-258, p. 75-83, 2006.

CLARKSON, J.; HERBISON, A. E. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology**, v. 147, p. 5817–5825, 2006.

CLARKSON, J.; HAN, S. K.; LIU, X.; LEE, K.; HERBISON, A.E. Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 324, p. 45-50, 2010.

D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; COLLEDGE, W.H. The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology (Bethesda, Md.)*, v.25, p.207-217, 2010.

DAY, M.L.; NOGUEIRA, G.P. Management of age at puberty in beef heifers to optimize efficiency of beef production. **Animal Frontiers**, v. 3.4, p. 6-11, 2013.

DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J.C.; MATSUDA, F., CHAUSSIAIN, J.L.; MILGROM, E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, p. 10972-10976, 2003.

DHILLO, W. S.; CHAUDHRI, O. B.; PATTERSON, M.; THOMPSON, E. L.; MURPHY, K. G.; BADMAN, M. K.; McGOWAN, B. M.; AMBER, V.; PATEL, S.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, p. 6609–6615, 2005.

DUNGAN, H.M.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R. A. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 147, p. 1154-1158, 2006.

ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S.; TEIXEIRA, L.A. Seleção para precocidade sexual em novilhas de corte. In: PIRES, A.V. (Ed.). **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: Fealq, 2010. p. 801-811.

EZZAT AHMED, A.; SAITO, H.; SAWADA, T.; YAEGASHI, T.; YAMASHITA, T.; HIRATA T.I.; SAWAI, K.; HASHIZUME, T. Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, folliclestimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 55, p. 650-654, 2009.

FERRAZ JUNIOR, M. V. C.; BIEHL, M. V.; GOUVÊA, V. N.; POLIZEL, D. M.; RIBEIRO, A. D. B.; SANTOS, M. H.; SILVA, R. G.; MOREIRA, E. M.; FALEIRO NETO, J. A.; PIRES, A. V. Puberdade em novilhas zebuínas: manejo e mecanismos para a antecipação. In: SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA EM NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL, 8., 2014, Pirassununga. **Novos desafios da pesquisa em nutrição e produção animal**, 14., 2014, Pirassununga: 5D, 2014. p. 26-40.

FERREIRA, E. M.; FERRAZ JUNIOR, M. V. C.; NEPOMUCENO, D. D.; BIEHL, M. V.; Mendes, C.Q.; PIRES, A. V. Efeito da produção de novilhas à pasto sobre a puberdade. In: RODRIGUES, R. C.; PARANTE, M. O. (Org.). **SIMPRUPASTO**: o uso da ciência e de tecnologias para a mudança de paradigmas. 1ed. Chapadinha: Edufma, 2012. v. 1, p. 128-158.

FRANCO, G.L. Desafios da interação entre aspectos nutritivos e reprodutivos do gado de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE DESAFIOS E NOVAS TECNOLOGIAS NA BOVINOCULTURA DE CORTE, 1., 2005. Brasília. **Anais...**, Brasília, DF: I SIMBOI, 2005. p. 35.

GEORGE, J. T.; VELDHUIS, J. D.; ROSEWEIR, A. K.; NEWTON, C. L.; FACCENDA, E.; MILLAR, R. P.; ANDERSON, R. A. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, p. 1228–1236, 2011.

HAN, S.T.; GOTTSCH, M.L.; LEE, K.J.; POPA, S.M.; SMITH, J.T.; JAKAWICH, S.K.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A.; HERBISON, A.E. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 11349–11356, 2005.

HASHIZUME, T.; SAITO, H.; SAWADA, T.; YAEGASHI, A.; EZZAT, A. A.; SAWAI, K.; YAMASHITA, T. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 37–41, 2010.

HINEY, J. K.; SRIVASTAVA, V. K.; PINE, M. D.; LES DEES, W. Insulin-like growth factor-I activates KiSS-1 gene expression in the brain of the prepubertal female rat. **Endocrinology**, v. 150, p. 376–384, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Rebanhos de bovinos e búfalos crescem, rebanho de equinos fica estável, enquanto asininos e muares caem.** 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2241&id_pagina=1>. Acesso em: 21 fev. 2013.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Bovinos e bubalinos. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. (Ed.) **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. p. 159-171.

KADOKAWA, H.; MATSUI, M.; HAYASHI, K.; MATSUNAGA, N.; KAWASHIMA, C.; SHIMIZU, T.; KIDA, K.; MIYAMOTO, A. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. **The Journal of Endocrinology**, v. 196, p. 331-334, 2008.

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

KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D.; VANDERWINDEN, J. M.; LE POUL, E.; BRÉZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; SUAREZ-HUERTA, N.; VANDEPUT, F.; BLANPAIN, C.; SCHIFFMANN, S. N.; VASSART, G.; PARMENTIER, S. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins , the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 34631–34636, 2001.

LUQUE, R. M.; KINEMAN, R. D.; TENA-SEMPERE, M. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors:

analyses using mouse models and a cell line. **Endocrinology**, v. 148, p. 4601–4611, 2007.

MACEDO, G. G.; MAIO, J. R. G.; MONTEIRO, B. M.; BATISTA, E. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SOARES, J.G.; SÁ FILHO, M.F.; SANTOS, G. M.; MENDANHA, M.F.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P.S. Kisspeptin stimulates LH release, is enhanced by estradiol and induces ovulation in bovine females. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 411, 2013.

MAIOLI, M. A.; NOGUEIRA, G. P. Padronização da quantificação do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) em plasma bovino por ELISA. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1545-1553, 2017.

MAQUIVAR, M. G. **Nutritional regulation of precocious puberty in heifers**. 150 f. 2011. Tese Doutorado – Universidade Estadual de Ohio, Atenas, 2011.

MATSUI, H.; TAKATSU, Y.; MATSUMOTO, H.; OHTAKI, T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 383-388, 2004.

NANIWA, Y.; NAKATSUKASA, K.; SETSUDA, S.; OISHI, S.; FUJII, N.; MATSUDA, F.; UENOYAMA, Y.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K.; OHKURA, S. Effects of full-length kisspeptin administration on follicular development in Japanese Black beef cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, p. 588-594, 2013.

NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; MAYEN, A.; BARREIRO, M. L.; CASANUEVA, F. F.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Effects of

KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. **Endocrinology**, v. 146, p. 1689–1697, 2005a.

NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; MAYEN, A.; NOGUEIRAS, R.; VAZQUEZ, M. J.; BARREIRO, M. L.; MAGNI, P.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Characterization of the potent luteinizing hormone releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. **Endocrinology**, v. 146, p. 156-163, 2005b.

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

OHTAKI, T.; SHINTANI, Y.; HONDA, S.; MATSUMOTO, H.; HORI, A. KANEHASHI, K.; TERAOKA, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; MASUDA, Y.; ISHIBASHI, Y.; WATANABE, T.; ASADA, M.; YAMADA, T.; SUENAGA, M.; KITADA, C.; USUKI, S.; KUROKAWA, T.; ONDA, H.; NISHIMURA, O.; FUJINO, M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v.411, p. 613–617, 2001.

PRALONG, F. P. Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 324, p. 82–86, 2010.

QUENNELL, J. H.; MULLIGAN, A. C.; TUPS, A.; LIU, X.; PHIPPS, S. J.; KEMP, C. J., HERBISON, A. E.; GRATTAN, D. R.; ANDERSON, G. M. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. **Endocrinology**, v. 150, p. 2805–2812, 2009.

ROA, J.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of

reproductive function. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, p. 48–69, 2008.

SCHNEIDER, J. E. Energy balance and reproduction. **Physiology & Behavior**, v. 81, p. 289–317, 2004.

SEMINARA, S. B.; DIPIETRO, M. J.; RAMASWAMY, S.; CROWLEY JR, W. F.; PLANT, T. M. Continuous human metastatin 45–54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. **Endocrinology**, v. 147, p. 2122–2126, 2006.

SEMINARA, S. B.; MESSENGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R.; ACIERNO JUNIOR, J. S.; SHAGOURY, J. K.; BO-ABBAS, Y.; KUOHUNG, W.; SCHWINOF, K. M.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; KAISER, U. B.; SLAUGENHAUPT, S. A.; GUSELLA, J. F.; O'RAHILLY, S.; CARLTON, M. B. L.; CROWLEY JR, W. F.; APARICIO, S. A. J. R.; COLLEDGE, W. H. The GPR54 gene as a regulator of puberty. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1614-1627, 2003.

SEMMELMANN, C.E.N.; LOBATO, J.F.; ROCHA, M.G. Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 835-843, 2001.

SHAHAB, M.; MASTRONARDI, C.; SEMINARA, S. B.; CROWLEY, W. F.; OJEDA, S. D.; PLANT, T. M. Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 2129-2134, 2005.

SKINNER, D. C.; CARATY, A.; ALLINGHAM, R. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. **Endocrinology**, v. 142, p. 573-579, 2001.

SMITH, J. T. Sex steroid control of hypothalamic Kiss 1 expression in sheep and rodents: comparative aspects. **Peptides**, v. 30, p. 94-102, 2009a.

SMITH, J. T. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 43, p. 75–84, 2012.

SMITH, J. T.; LI, Q.; PEREIRA, A.; CLARKE, I. J. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 150, p. 5530-5538, 2009b.

SMITH, J. T.; ACOHIDO, B. V.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, p. 298–303, 2006.

TENA-SEMPERE, M. Deciphering puberty: novel partners, novel mechanisms. **European Journal of Endocrinology**, v. 167, p. 733-747, 2012.

TENA-SEMPERE, M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, p. 164–169, 2010.

WHITLOCK, B. K. **Kisspeptin, a novel hypothalamic regulator of the somatotrophic and gonadotropic axes in ruminants**. USA: ProQuest, 2011. 244 p.

